

NIKOTIININ JA OPIOIDIEN INTERAKTIOT

Juri Meijer
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmakologian ja toksikologian osasto

Lokakuu 2012

| | | | |
|---|--|---|--|
| Tiedekunta – Fakultet – Faculty Farmasian tiedekunta | | Osasto – Sektion – Department Farmakologian ja toksikologian osasto | |
| Tekijä – Författare – Author Juri Meijer | | | |
| Työn nimi – Arbetets titel – Title Nikotiinin ja opioidien interaktiot | | | |
| Oppiaine – Läroämne – Subject Farmakologia | | | |
| Työn laji – Arbetets art – Level Pro Gradu-tutkielma | | Aika – Datum – Month and year Lokakuu 2012 | Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 92 |
| <p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Tupakointi on eräs merkittävimpiä ennen aikaista kuolemaa aiheuttavista tekijöistä maailmanlaajuisesti. Tupakasta saatava nikotiini vaikuttaa elimistössä neuronaalisten asetyylikoliinin nikotiinireseptoreja (nAChR) aktivoiden. nAChR:t ovat osa kolinergista hermojärjestelmää, jonka välittäjäaineena toimii asetyylikoliini. Toiminnaltaan nAChR:t ovat hermosoluja aktivoivia ja ne säätelevät usein muiden välittäjäaineiden vapautumista. Nikotiini on voimakkaasti riippuvuutta aiheuttava yhdiste. Sen palkitsevat vaikutukset välittyvät mesolimbisen dopamiiniradan aktivoitumisen kautta. Myös endogeenisen opioidijärjestelmän agonistit saavat aikaan mesolimbisen dopamiiniradan aktivoitumisen välittämällä siten opioidien palkitsevia vaikutuksia ja riippuvuutta.</p> <p>Opioidien ja nikotiinin interaktioista on julkaistu useita tutkimuksia. On havaittu, että valtaosa opioidien väärinkäyttäjistä ja korvaushoitoa saavista tupakoi. Lisäksi tupakoivien kivunhoidossa joudutaan usein käyttämään suurempia opioidiannoksia kuin tupakoimattomilla. <i>In vivo</i> nikotiinin on todettu vapauttavan opioidipeptidejä riippuvuutta ja kivunlievitystä välittävillä aivoalueilla. Toisaalta nikotiinin palkitsevat vaikutukset heikkenevät opioidireseptori-poistogeenisillä jyrksijöillä. Eläinkokeissa opioidireseptorien antagonistilla on lisäksi onnistuttu vähentämään nikotiinin palkitsevia vaikutuksia. Tupakoinnin haitallisuuden vuoksi siitä vierottamiseksi myös ihmisillä on tutkittu opioidireseptorien salpausta. Tulokset eivät ole kuitenkaan olleet kliinisesti merkittäviä. <i>In vitro</i>-kokeissa monien kliinisessä käytössä olevilla opioideilla on puolestaan havaittu esiintyvän erilaisia, suoria reseptoritason vuorovaikutuksia nAChR:ien kanssa. Esimerkiksi metadonin ja morfiinin on havaittu vaikuttavan nAChR:ien toimintaan <i>in vitro</i>. Tämä saattaa selittää osittain opioidikorvaushoitoa saavien tupakointikäyttäytymistä.</p> <p>Kliinisessä käytössä opioideja käytetään pääasiassa kohtuullisen ja voimakkaan kivun hoidossa. Eläinkokeissa myös nikotiinin on havaittu toimivan kipua lieventävänä yhdisteenä, mutta ihmisillä sen vaikutus on ollut kyseenalainen. Erikoistyössä tutkittiin yleisesti kivunlievityksessä käytettävien opioidien, kodeiinin, oksikodonin ja tramadolin sitoutumista ja toiminnallista vaikutusta ihmisen $\alpha 4\beta 2$-nAChR:hin <i>in vitro</i> SH-EP1-$\alpha 4\beta 2$-solulinjalla. Sitoutumista tutkittiin [3H]-epibatidiinin kilpailevan sitoutumisen menetelmällä ja toiminnallista vaikutusta $^{86}\text{Rb}^+$-ulosvirtauskokeella. Oksikodoni ja tramadoli osoittautuivat erikoistyössä $\alpha 4\beta 2$-nAChR:ien heikoiksi kilpaileviksi antagonisteiksi <i>in vitro</i> kliinisesti irrelevanteilla pitoisuuksilla. Kodeiini toimi sen sijaan Alzheimerin taudin hoidossa käytettävän galantamiinin kaltaisena, $\alpha 4\beta 2$-nAChR:n positiivisena allosteerisena modulaattorina voimistaen nikotiinin vaikutuksia mikromolaarisilla pitoisuuksilla.</p> <p>Kodeiinin aikaansaaman, nikotiinin $\alpha 4\beta 2$-nAChR:n toimintaa voimistavan vaikutuksen kliinistä merkitystä ei voi arvioida tehtyjen kokeiden perusteella. Tulosten vahvistaminen vaatii tutkimuksia <i>in vivo</i> esimerkiksi $\alpha 4$- ja $\beta 2$-poistogeenisillä hiirillä, jotta $\alpha 4\beta 2$-nAChR:n vaikutus kodeiinin kivunlievitykseen ja palkitseviin vaikutuksiin selviäisi. Erikoistyön tulokset antavat kuitenkin arvokasta lisätietoa nikotiinin ja opioidien interaktioista, sillä tuloksia etenkin $\alpha 4\beta 2$-nAChR:lla tehdyistä tutkimuksista ei ole toistaiseksi julkaistu tarpeeksi ilmiön riittävän hyödyntämisen kannalta muun muassa päihderiippuvuuden tai kivun hoidossa.</p> | | | |
| Avainsanat – Nyckelord – Keywords nikotiini, opioidi, nAChR, riippuvuus, kodeiini, oksikodoni, tramadoli, $^{86}\text{Rb}^+$-ulosvirtaus | | | |
| Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Farmakologian ja toksikologian osasto | | | |
| Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Ohjaaja Reeta Talka | | | |

| | | | |
|---|--|---|--|
| Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Pharmacy | | Osasto – Sektion – Department Department of Pharmacology and Toxylogy | |
| Tekijä – Författare – Author Juri Meijer | | | |
| Työn nimi – Arbetets titel – Title Interactions between nicotine and opioids | | | |
| Oppiaine – Läroämne – Subject Pharmacology | | | |
| Työn laji – Arbetets art – Level Master's Thesis | | Aika – Datum – Month and year October 2012 | Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 92 |
| Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Smoking is one of the major causes for premature deaths worldwide. Tobacco smoke contains nicotine, which activates the nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) expressed by the human body. nAChRs are part of the cholinergic system and its endogenous neurotransmitter is acetylcholine. The nAChRs are excitatory and the often regulate the release of other neurotransmitters. Nicotine is one of the most addicting compounds known. The rewarding effects of nicotine are mediated through the activation of the mesolimbic dopamine pathway. The mesolimbic pathway is triggered also by the compounds activating the endogenous opioid system thus mediating the rewarding effects and opioid addiction.</p> <p>The nicotine – opioid interactions have been widely studied. It is observed that majority of opioid abusers and patients receiving opioid replacement therapy are smokers. It has been also detected that nicotine releases endogenous opioid peptides <i>in vivo</i> in the brain regions mediating both addiction and analgesia. In addition, the rewarding effect of nicotine attenuates in opioid receptor knock-out rodents. Furthermore, it has been observed that nicotine's rewarding effects can be reduced with opioid receptor antagonists. In order to prevent smoking's negative effects the use opioid antagonists for smoking cessation has been clinically researched with poor results. Many of the opioids in clinical use have diverse and direct interaction with the nAChRs <i>in vitro</i>. E.g. it has been observed that methadone and morphine have an effect on the function of the nAChRs. This may explain partially the smoking behaviour of replacement therapy patients.</p> <p>Opioids are prescribed mainly for the treatment of moderate to intense pain. Nicotine is too found to be analgesic <i>in vivo</i> but in humans its analgesic effect has been questionable. In the experimental part of thesis binding and functional interactions with human's $\alpha 4\beta 2$-nAChR expressed by SH-EP1-h$\alpha 4\beta 2$ cell line was researched with clinically commonly used opioids codeine, oxycodone and tramadol. Competitive binding was studied using [³H]-epibatidine binding assay and the functional effects were studied using ⁸⁶Rb⁺-efflux assay. The results suggest that oxycodone and tramadol act as weak competitive antagonists of $\alpha 4\beta 2$-nAChR <i>in vitro</i> in concentrations that are clinically irrelevant. According to the results, however, codeine acts as positive allosteric modulator of $\alpha 4\beta 2$-nAChR potentiating the effects of nicotine in micromolar concentrations. The effect is similar to galantamine, used in treatment of Alzheimer's disease.</p> <p>The clinical relevance of codeine's potentiating nicotine's effect on the function of $\alpha 4\beta 2$-nAChR cannot be estimated according to the results from these studies. Therefore, in order to confirm the results experiments with codeine need to be done <i>in vivo</i> using e.g. $\alpha 4$- and $\beta 2$-knock-out mice in order to clarify $\alpha 4\beta 2$-nAChR's role in the analgesic and rewarding effects of codeine. However, the results from the experimental part provide valuable information on the interactions of nicotine and opioids. Results from studies conducted with $\alpha 4\beta 2$-nAChRs have not been published enough to determine the importance of the phenomenon in i.a. drug addiction and analgesia.</p> | | | |
| Avainsanat – Nyckelord – Keywords nicotine, opioid, nAChR, addiction, codeine, oxycodone, tramadol, ⁸⁶Rb⁺-efflux | | | |
| Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Department of Pharmacology and Toxycology | | | |
| Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisor Reeta Talka | | | |

SISÄLLYSLUETTELO

KIRJALLINEN OSA:

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | JOHDANTO..... | 1 |
| 2 | NEURONAALISET ASETYYLIKOLIININ NIKOTIINIRESEPTORIT | 2 |
| 2.1 | Neuronaalisten asetyylikoliinin nikotiinireseptorien toiminta | 5 |
| 2.2 | Neuronaalisten asetyylikoliinin nikotiinireseptorien alatyypit keskushermostossa..... | 8 |
| 2.2.1 | $\alpha 4\beta 2^*$ -alatyypin asetyylikoliinin nikotiinireseptorit..... | 10 |
| 2.2.2 | $\alpha 7^*$ -alatyypin asetyylikoliinin nikotiinireseptorit..... | 12 |
| 2.2.3 | Muita keskeisiä neuronaalisia asetyylikoliinin nikotiinireseptorin alatyyppejä..... | 14 |
| 3 | ENDOGEENINEN OPIOIDIJÄRJESTELMÄ..... | 15 |
| 3.1 | Endogeenisen opioidijärjestelmän reseptorit | 16 |
| 3.2 | Endogeeniset opioidipeptidit..... | 18 |
| 3.2.1 | Pro-opiomelanokortiinin johdannaiset..... | 19 |
| 3.2.2 | Pro-enkefaliinin johdannaiset | 20 |
| 3.2.3 | Pro-dynorfiinin johdannaiset | 20 |
| 4 | NIKOTIINI, OPIOIDIT JA LÄÄKEAINERIIPPUVUUS | 21 |
| 4.1 | Opioidit ja riippuvuus | 22 |
| 4.2 | Nikotiini ja riippuvuus | 24 |
| 4.3 | Nikotiinin ja opioidien interaktiot riippuvuudessa..... | 27 |
| 4.3.1 | Opioidiantagonistien käyttö tupakasta vieroituksessa | 31 |
| 4.3.2 | Opioidikorvaushoitopotilaat ja tupakointi | 32 |
| 5 | NIKOTIINI JA OPIOIDIT KIVUNLIEVITYKSESSÄ | 34 |
| 5.1 | Opioidit kivun lievityksessä..... | 35 |
| 5.2 | Nikotiini kivun lievityksessä..... | 38 |
| 5.3 | Nikotiinin ja opioidien interaktiot kivun hoidossa..... | 44 |
| 6 | YHTEENVETO | 46 |

KOKEELLINEN OSA:

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | JOHDANTO | 48 |
| 2 | MATERIAALIT | 51 |
| 2.1 | SH-EP1- $\alpha 4\beta 2$ solulinja | 51 |
| 2.2 | Reagenssit | 51 |
| 2.3 | Laitteet..... | 53 |
| 3 | MENETELMÄT..... | 54 |
| 3.1 | Solujen viljely | 54 |
| 3.2 | Kudoshomogenaatin valmistaminen | 54 |
| 3.3 | Saturaatiositoutuminen..... | 55 |
| 3.4 | Kilpaileva sitoutuminen | 56 |
| 3.5 | $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtauskoe | 56 |
| 3.6 | Datan analysointi..... | 57 |
| 4 | TULOKSET | 58 |
| 4.1 | $[^3\text{H}]$ -epibatidiinin saturaatiositoutuminen SH-EP1- $\alpha 4\beta 2$ solukalvohomogenaatessa..... | 58 |
| 4.2 | Kilpaileva sitoutuminen SH-EP1- $\alpha 4\beta 2$ soluissa..... | 59 |
| 4.3 | $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtausstimulaatio | 59 |
| 4.4 | Opioidien vaikutus kasvavan nikotiinipitoisuuden aiheuttamaan $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtaukseen | 60 |
| 4.5 | Kasvavan opioidipitoisuuden vaikutus nikotiinin aiheuttamaan $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtaukseen | 61 |
| 5 | POHDINTA..... | 64 |
| 6 | YHTEENVETO | 69 |
| 7 | KIITOKSET | 70 |
| | KIRJALLISUUSLUETTELO | 71 |

Lyhenteet:

| | |
|---------------|---|
| $[Ca^{2+}]_i$ | Solunsisäinen kalsiumpitoisuus |
| 5-HT | 5-hydroksitryptamiini eli serotoniini |
| ACh | Asetyylikoliini |
| AChEI | Asetyylikoliiniesteraasin estäjä |
| arcN | Kaaritumake (nucleus arcuatus) |
| cAMP | Syklinen adenosiinimonofosfaatti |
| C_{max} | Yhdisteen plasman huippupitoisuus |
| GABA | γ -aminovoihappo |
| mRNA | Lähetti-RNA |
| MAPK | Mitogeenin aktivoima proteiinikinaasi |
| Nacc | Accumbens-tumake |
| nAChR | Neuronaalinen asetyylikoliinin nikotiinireseptori |
| NRM | Raphe magnus-tumake |
| PAG | Periakveduktaalinen harmaa alue |
| PAM | Positiivinen allosteerinen modulaattori |
| PDYN | Prodynorfiinit |
| PENK | Proenkefaliinit |
| PKA | Proteiinikinaasi A |
| PKC | Proteiinikinaasi C |
| POMC | Pro-opiomelanokortiini |
| RVM | Rostraalinen ventromediaalinen ydinjatke |
| SN | Mustatumake (substantia nigra) |
| TH | Tyrosiinihydroksylaasi |
| TPP | Tegmentaalinen pedunkulopontiivinen tumake |
| VTA | Ventraalinen tegmentaalin alue |

1 JOHDANTO

Tupakointia pidetään maailmanlaajuisesti eräänä merkittävimmistä ennenaikaista kuolemaa aiheuttavista tekijöistä (Mathers ja Loncar 2006). Suomessa vuonna 2010 työikäisistä miehistä 23 % ja naisista 16 % tupakoi päivittäin, joten riski ennenaikaiseen kuolemaan tupakoinnista johtuvien komplikaatioiden seurauksena koskettaa Suomessa merkittävää osaa aikuisväestöstä (Helakorpi ym. 2011). Tupakointi on voimakkaasti riippuvuutta aiheuttavaa ja keskeisin tupakan sisältämistä, riippuvuutta aiheuttavista yhdisteistä on nikotiini (Benowitz 2009). Nikotiini sitoutuu äärimmäisen voimakkaasti etenkin keskushermostossa laaja-alaisesti esiintyviin neuronaalisiin asetyylikoliinin nikotiinireseptoreihin (nAChR) (Albuquerque ym. 2009). nAChR:t ovat osa keskushermoston kolinergista hermojärjestelmää, jonka endogeeninen välittäjäaine on asetyylikoliini (ACh) (Perry ym. 1999).

Valtaosa opioidikorvaushoitoa saavista potilaista tupakoi (Elkader ym. 2009; Pajusco ym. 2012). Opioidit, kuten heroiini, vaikuttavat elimistössä aktiivisella endogeenisella opioidijärjestelmällä (Trigo ym. 2010). Nikotiini ja opioidit aiheuttavat riippuvuutta lisäämällä dopamiinin vapautumista samoissa keskiaivon tumakkeissa, joiden tiedetään osallistuvan keskeisimmin riippuvuudessa ja yhdisteiden palkitsevien vaikutusten ilmentymisessä (Stinus ym. 1980; Stinus ym. 1992; Benwell ja Balfour 1992). Koska kolinergisella hermojärjestelmällä ja endogeenisellä opioidijärjestelmällä esiintyy selkeästi päällekkäisyyksiä riippuvuudesta vastaavilla aivoalueilla, interaktion hyödyntämistä on tutkittu nikotiiniriippuvaisten mahdollisena hoitokeinona (Sutherland ym. 1995; Covey ym. 1999; O'Malley ym. 2006). Toisaalta on pyritty myös selvittämään, miten tupakointi ja nikotiini vaikuttavat opioidiriippuvaisten vieroitushoitoon (Clarke ym. 2001; McCool ja Paschall Richter 2003; Spiga ym. 2005).

Endogeenisen opioidijärjestelmän kautta vaikuttavia yhdisteitä, kuten morfiinia ja oksikodonia, käytetään kliinisesti kivunlievitykseen (Holden ym. 2005). Myös nikotiinilla on havaittu kipua lievittäviä vaikutuksia (Damaj ym. 1998). Nikotiinin ja nAChR:ien osuutta endogeenisen opioidijärjestelmän ja opioidijärjestelmän roolia kolinergisen hermojärjestelmän kautta välittyvään kivunlievitykseen on niin ikään

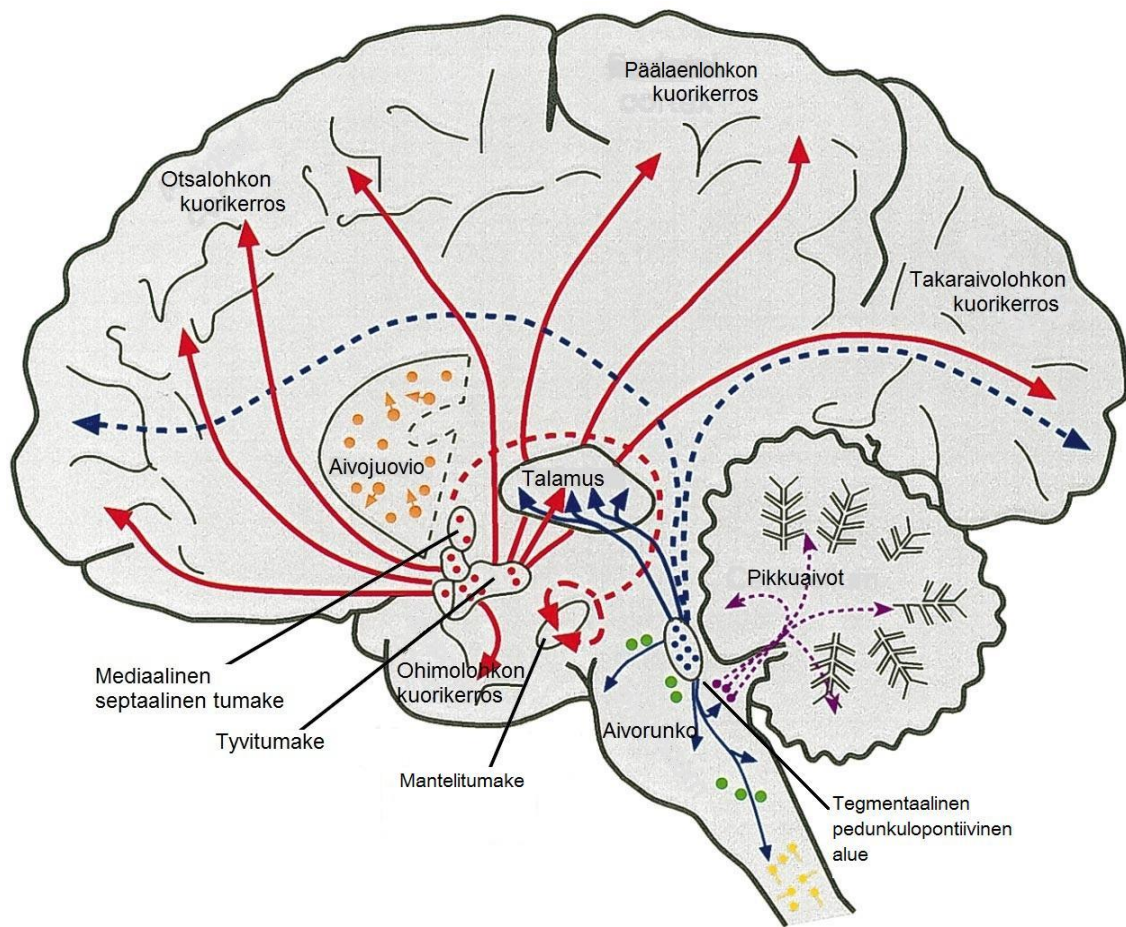
tutkittu (Schmidt ym. 2001; Berrendero ym. 2002; Creekmore ym. 2004). Tupakoiden on havaittu tarvitsevan suurempia opioidiannoksia esimerkiksi leikkauksenjälkeiseen kipuun tupakoimattomiin henkilöihin verrattuna. Ilmiö on herättänyt tutkijoiden mielenkiinnon, sillä sen mekanismi ei ole täysin selvillä.

Tässä pro gradu-tutkielmassa tarkastellaan nikotiinin ja opioidien interaktioita riippuvuudessa ja kivunlievityksessä. Näiden aiheiden tukemiseksi tutkielmassa käydään läpi nAChR:ien rakennetta, toimintaa ja muita erityispiirteitä, jotka liittyvät kolinergisen hermojärjestelmän välittämiin vaikutuksiin. Erikoistyön kirjallisessa osassa tarkastellaan myös endogeenista opioidijärjestelmää ja siihen kuuluvia reseptoreita. Tarkoituksena on saada yleiskäsitys opioidien ja nikotiinin interaktioista: mitä aiheesta tiedetään toistaiseksi ja mitkä asiat vaativat lisäselvityksiä.

2 NEURONAALISET ASETYYLIKOLIININ NIKOTIINIRESEPTORIT

Asetyylikoliini on keskushermoston yleisimpiä välittäjäaineita ja keskushermoston kolinergisia ratoja pidetään yhtenä tärkeimmistä muista hermoratoja säätelevistä välittäjäainejärjestelmistä (Perry ym. 1999). Kolme keskeisintä kolinergista hermorataa saavat alkunsa aivorungon yläpuolisilta alueilta (Kuva 1) (Dani ja Bertrand 2007). Ensimmäinen niistä saa alkunsa etuaivojen pohjassa sijaitsevista, kolinergisia hermosoluja sisältävistä tumakkeista. Keskeisimpiä näistä tumakkeista ovat tyvitumake (nucleus basalis) ja mediaalinen septaalinen tumake (medial septal nucleus). Kyseisten tumakkeiden kolinergiset hermosyyt ulottuvat erittäin laajalle alueelle isoajoja (Kuva 1). Toinen merkittävä kolinerginen hermorata saa alkunsa tegmentaalisesta pedunkulopontiivisesta tumakkeesta (tegmental pedunclopontine nucleus) (TPP) sijaitsevista kolinergisista hermosoluista (Kuva 1). TPP sijaitsee aivorungon alueella aivosillan takaosassa, läheltä pikkuaivovartta. TPP:stä lähtevät hermoradat päätyvät keskiaivojen dopaminergisiin tumakkeisiin ja talamukseen. Lisäksi TPP:stä lähtee laskevia kolinergisia hermoratoja aivorunkoon ja aivosiltaan. Edellä mainitut kolinergiset hermoradat ulottuvat basaalisten kolinergisten hermoratojen tavoin lähestulkoon koko aivojen alueelle (Kuva 1). Kolmas merkittävä kolinerginen

hermorata saa alkunsa aivojuovion alueelta. Sieltä lähtevät kolinergiset hermosyyt osallistuvat paikallisesti aivojuovion muiden neuronien säätelyyn (Kuva 1). Kyseisillä hermosoluilla on myös runsaasti yhteyksiä hajukyhmyyn (olfactory tubercle). Tämä kolinerginen hermorata poikkeaa kahdesta aiemmasta juuri paikallisen vaikutuksensa vuoksi; sen hermoradat eivät ulotu läheskään yhtä laajalle alueelle kuin basaaliset ja pedunkulopontiiviset hermoradat.



Kuva 1. Aivojen kolinergiset hermoradat (mukaillen Perry ym. 1999). Keskeisimmät kolinergiset hermoradat ovat etuaivojen pohjan basaaliset kolinergiset hermoradat (merkitty punaisella), jotka ulottuvat käytännössä koko isoainvojen alueelle, ja pedunkulopontiiviset hermoradat (sininen). Kuvaan on merkitty myös aivojuovion kolinergiset välineuronit (oranssi), aivohermon tumakkeet (vihreä), sisäkorvan eteistumakkeen hermoradat pikkuaivoihin (violetti) ja selkäytimen preganglionaariset hermosolut sekä liikehermosolut (keltainen).

Keskushermostossa asetyylikoliini sitoutuu kahteen erityyppiseen reseptoriin: G-proteiinivälitteiseen muskariinireseptoriin ja ionikanavarakenteiseen nikotiinireseptoriin

(Albuquerque ym. 2009). Muskariini- ja nikotiinireseptorien toiminnot ja merkitys keskushermostossa poikkeavat toisistaan huomattavasti ja tässä työssä käsitelläänkin ainoastaan neuronaaalisia asetyylikoliinin nikotiinireseptoreja.

nAChR:t koostuvat viidestä solukalvon läpäisevästä proteiinirakenteisesta alayksiköstä, jotka muodostavat nesteen täyttämän ionikanavan (Albuquerque ym. 2009). ACh toimii näiden reseptorien endogeenisena agonistina, mutta monet elimistön ulkopuoliset yhdisteet voivat aktivoida nAChR:ja. Jokaisessa alayksikössä on neljä solukalvon läpäisevää osaa ja siten nAChR:t kuuluvat neurotransmitterivälitteisten ionikanavareseptoreiden perheeseen (Karlin ja Akabas 1995). Samaan proteiinirakenteisten ionikanavien perheeseen kuuluvat γ -aminovoihapon (GABA) GABA_A-, glysiini- ja 5-hydroksitryptamiinin (5-HT) eli serotoniinin 5-HT₃ reseptorit. Nikotiinireseptoreja muodostavia alayksiköitä on tunnistettu yhteensä 15 erilaista, joista erityyppiset nAChR:t rakentuvat (Wu ja Lukas 2011). *Torpedo*-suvun meriraukun ja sähköankeriaan biokemiallisissa tutkimuksissa löydettiin ensimmäisenä neljä erilaista (α , β , γ ja δ) nAChR:ja muodostavaa alayksikköä (Popot ja Changeux 1984). Alayksiköt nimettiin kreikkalaisin aakkosin molekyylipainon mukaan kasvavassa järjestyksessä. α - ja β -alayksiköistä on löydetty useampia alamuotoja, jotka merkitään $\alpha 1$ - $\alpha 10$ ja $\beta 1$ - $\beta 4$. Ihmisen keskushermostossa näistä alamuodoista on löydetty $\alpha 2$ - $\alpha 10$ ja $\beta 2$ - $\beta 4$. γ - ja δ -alayksikköjä esiintyy lihassoluissa α - ja β -alayksiköiden kanssa siten, että γ -alayksikkö esiintyy kuitenkin vain alkiolla ja se korvaantuu myöhemmin tunnistetulla ϵ -alayksiköllä myöhemmässä iässä (Albuquerque ym. 2009).

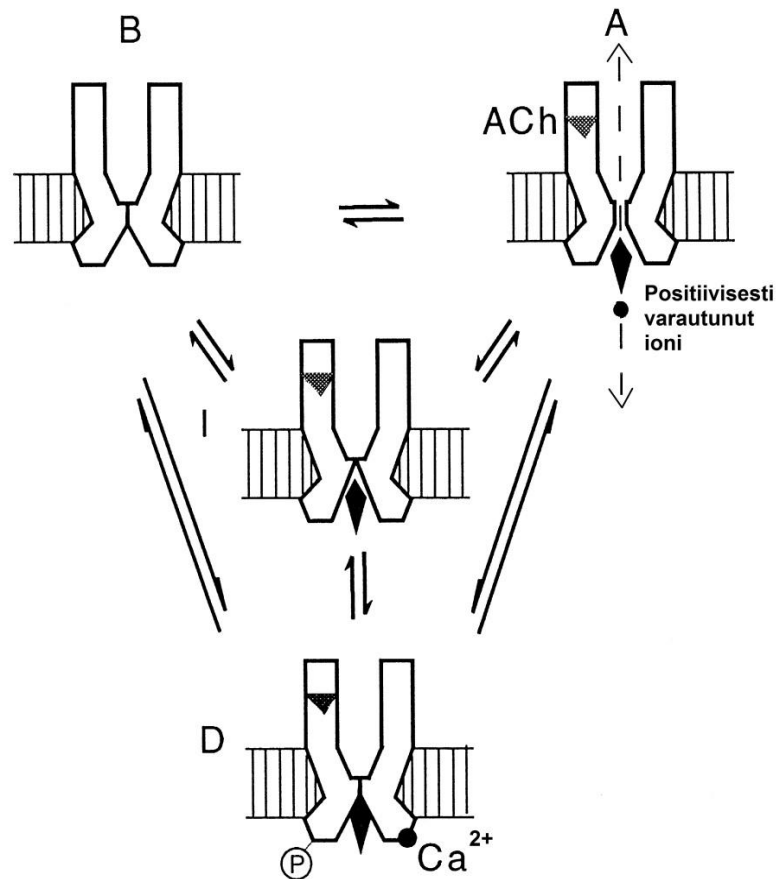
Yksittäiset nAChR-alatyypit voivat koostua yhdestä tai useasta erilaisesta alayksiköstä (Millar ja Gotti 2009). Reseptoripentameerien koostumiseen pätevät tietyt säännöt, jotta reseptori olisi toimiva. Jokaisessa löydetyssä nAChR:ssä vähintään yksi viidestä alayksiköstä on α -tyyppiä. Toisaalta on löydetty monomeerisiä nAChR:ja, jotka koostuvat ainoastaan $\alpha 7$ -, $\alpha 8$ - tai $\alpha 9$ -alatyksiköistä.. $\alpha 1$ - $\alpha 6$ -alayksiköitä sisältävät nAChR:t tarvitsevat siis myös muita alayksikkötyyppejä – joko α - tai β -tyyppisiä – jotta muodostuva reseptori toimisi. Lisäksi on havaittu, että sisäkorvan karvasoluissa esiintyvät, $\alpha 9$ -alayksiköistä koostuvat nAChR:t ilmentyvät yleisimmin heterologisina reseptoreina, joissa on mukana myös $\alpha 10$ -alatyyppejä (Elgoyhen ym 2001, Sgard ym.

2002). $\alpha 8$ -alayksikön muodostamia monopentameereja esiintyy ainoastaan linnuilla, mutta monomeeriset $\alpha 7$ -alatyypin reseptorit ovat eräitä yleisimpiä nAChR:ja nisäkkäiden keskushermostossa (Millar ja Gotti 2009). Mikäli reseptorin kaikkia alayksiköitä ei ole tunnistettu, stoikiomeria on tuntematon tai puhutaan reseptorialatyypistä, jossa esiintyy ainakin tiettyjä alayksiköitä, käytetään nAChR:n nimen perässä *-merkkiä. Esimerkiksi $\alpha 3\beta 2^*$ -nAChR:ssä esiintyy ainakin $\alpha 3$ - ja $\beta 2$ -alayksiköitä, mutta mahdollisesti muitakin alayksiköitä.

Asetyylikoliinin ja muiden nAChR:ien agonistien, kuten nikotiinin, sitoutumiskohta sijaitsee reseptorin muodostavien alayksiköiden välissä (Albuquerque ym. 2009). Sitoutumiskohdassa toisena alayksikkönä on α -tyypin alayksikkö, lukuun ottamatta $\alpha 5$ - ja $\alpha 10$ -alayksikköjä joiden rakenteesta puuttuu ligandin sitomiseen vaadittavat aminohapot. Sitoutumiskohdassa α -alayksikössä sijaitsee kahden kysteiini-aminohapon muodostama rikkisilta, jota ilman agonisti ei kykenisi sitoutumaan nAChR:hin. α -alayksikössä sijaitsevaa sitoutumiskohtaa kutsutaan ”etupuoleksi”. Sitoutumiskohdan ”takapuoli” sijaitsee $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 4$, γ , δ tai ϵ alayksikössä. Siten esimerkiksi $\alpha 3\beta 4$ -tyypin nAChR:ssä on kaksi agonistin sitoutumiskohtaa, yksi molempien α - ja β -alayksikön välissä. Homopentameerisessa $\alpha 7$ -reseptorissa agonistin sitoutumispaikkoja on puolestaan viisi.

2.1 Neuronaalisten asetyylikoliinin nikotiinireseptorien toiminta

Agonistin, esimerkiksi ACh:n tai nikotiinin, sitoutuessa nAChR:iin ionikanavan polypeptidiketjun konformaatio muuttuu (Changeux ym. 1998). Tällöin ionikanava avautuu siten, että positiivisesti varautuneita kationeita pääsee läpäisemään solukalvon. nAChR-alatyypistä riippuen ionikanava päästää lävitsensä K^+ -, Na^+ - ja/tai Ca^{2+} -ioneita (Kuva 2). Mikäli agonisti pysyy sitoutuneena nAChR:iin pidempiaikaisesti – esimerkiksi tupakoijilla, joiden plasman nikotiinipitoisuus pysyy vakaana ja etenkin tupakoinnin jälkeen korkeana – ionikanava sulkeutuu itsestään (Kuva 2). Tilaa, johon ionikanava muuttuu, kutsutaan kanavan epäherkistymiseksi (desensitoitumiseksi). Tällöin nAChR ei kykene aktivoitumaan matalilla agonistipitoisuuksilla.



Kuva 2. Agonistin vaikutus nikotiinireseptorin toimintaan (mukaillen Changeux ym. 1998). Normaalisti reseptori on niin sanotussa ”lepotilassa” (B), jolloin ionikanava on kiinni. Agonistin (esim. ACh:n) sitouduttua reseptoriin kanava aukeaa ja positiivisesti varautuneita Na^+ , K^+ ja Ca^{2+} -ioneja pääsee virtaamaan ionikanavan kautta solun sisään ja solusta ulos (A). Agonistin pysyessä sitoutuneena reseptoriin, ionikanava sulkeutuu suhteellisen nopeasti. Tällöin kanavan sanotaan olevan ”epäherkistyneenä” (desensitoituneena), eikä ionikanava aukene ennen agonistin irtoamista sitoutumiskohdastaan ja tietyn refraktaariajan kulumista. Epäherkistyminen voi olla lyhytaikaista (I), riippuen agonistin voimakkuudesta ja nAChR-alatyypistä, tai pitempikestoista (D). Epäherkistymisen tarkoituksena on estää solun vaurioituminen solunsisäisen ionipitoisuuden kasvaessa liian suureksi.

Agonistin aikaansaaman nAChR-aktivaation seurauksena soluun virranneet kationit depolarisoivat postsynaptisen solun solukalvon (Dani ja Bertrand 2007). Presynaptisen nAChR:n aktivoituminen puolestaan aikaansaa kyseisen hermosolun ilmentämien välittäjäaineiden vapautumisen synapsirakoon. Depolarisaatiosta vastaavat pääasiassa Na^+ - ja Ca^{2+} -ionit. Eri alatyypin nAChR:t ovat jokseenkin selektiivisiä lävitseen päästämiensä kationien, etenkin Ca^{2+} -ionien suhteen (Jensen ym. 2005). Ionikanavan

aminohappokoostumus vaikuttaa suoraan erilaisten kationien läpäisevyyteen (Bertrand ym. 1993). On esimerkiksi havaittu, että Ca^{2+} -ionit läpäisevät helpoimmin nAChR-ionikanavan, jonka solunsisäisellä suuaukolla esiintyy varautuneita aminohappotähteitä, esimerkiksi glutamaattia. nAChR:ien suhteen ei voida puhua kuitenkaan spesifisesti Ca^{2+} -ioneja läpäisevistä ja läpäisemättömistä ionikanavista, sillä Ca^{2+} -ionit siirtyvät solun sisään jokaisen nAChR-alatyypin kautta (Dajas-Bailador ja Wonnacott 2004). Eri nAChR-alatyypin suhteellinen Ca^{2+} -läpäisevyys Na^+ -ionien suhteen vaihtelee noin 2 %:sta 12 %:iin (Fucile ym. 2003; Fucile 2004).

nAChR-ionikanavan aukeamisen ja reseptoriaktivaation seurauksena soluun virranneet Na^+ - ja Ca^{2+} -ionit saavat aikaan solunsisäisen Ca^{2+} -pitoisuuden ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) nousun (Dajas-Bailador ja Wonnacott 2004). Tätä kautta nAChR-aktivaation seurauksena solun toiminnassa saattaa tapahtua merkittäviäkin muutoksia. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ voi kasvaa suoran Ca^{2+} -ionien soluun virtaamisen lisäksi myös jänniteherkkien Ca^{2+} -ionikanavien avautumisen sekä solunsisäisten Ca^{2+} -ionivarastojen vapautumisen seurauksena (Tsuneki ym. 2000; Dajas-Bailador ym. 2003). $[\text{Ca}^{2+}]_i$:n lisääntyminen saa aikaan useiden eri toisiolähetinjärjestelmien aktivoitumisen ja siten erilaisten vasteiden ilmentymisen (Dajas-Bailador & Wonnacott 2004). Yksinkertaisimmillaan presynaptisten nAChR:ien aktivaation seurauksena hermopäätteestä vapautuu välittäjäaineita synapsirakoon suoraan Ca^{2+} -ionien vaikutuksesta (Wonnacott 1997). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nousun seurauksena välittäjäaineiden vapautuminen lisääntyy myös voimistuneen proteiinikinaasi C:n (PKC) aktivaation seurauksena (Soliakov ja Wonnacott 2001).

Pitkäaikaisen nikotiinialtistuksen seurauksena katekoliamiinien, kuten dopamiinin ja noradrenaliinin, synteesissä keskeisen tyrosiinihydroksylaasi-entsyymin (TH) ilmentymisen lisääntyminen sekä *in vitro* että *in vivo* (Ferrari ym. 2011). TH:n lisääntynyt ilmentyminen välittyy proteiinikinaasi A:n (PKA) aktivoitumisen kautta, jonka toiminta on suoraan riippuvainen kasvaneeseen $[\text{Ca}^{2+}]_i$:een (Gueorguiev ym. 1999). TH:n ilmentyminen lisääntyy kuitenkin vasta pitkittyneen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kasvun seurauksena, jolloin PKA aktivoi ERK/MAPK-proteiinikinaasin (ekstrasellulaarisen regulatorisen ja mitogeenin aktivoiman proteiinikinaasin) (Griffith & Marelly 2001). Samat toisiolähetit on yhdistetty myös kolinergisen järjestelmän kognitiivista toimintaa

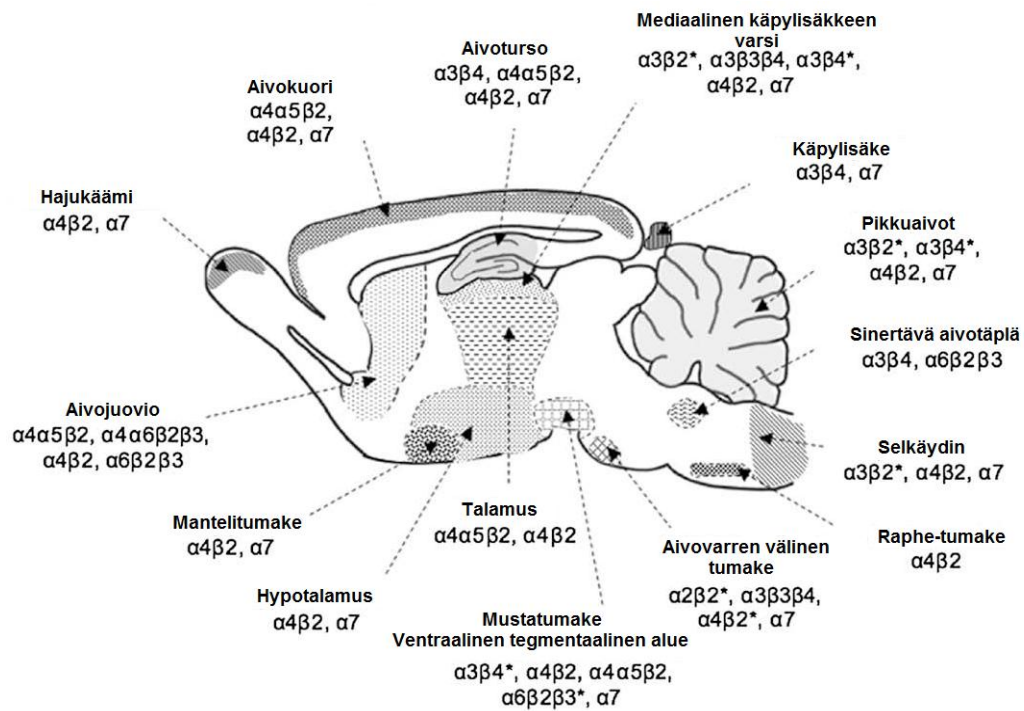
parantavaan vaikutukseen (Lewin ja Simon 1998). nAChR:ien vaikutus muistitoimintojen paranemiseen onkin liitetty lisääntyneeseen hermojen muovautuvuuteen keskushermoston tärkeimmillä muistiin liittyvillä alueilla, kuten aivotursossa (Ji ym. 2001).

Pitkään kestäneen nikotiinialtistuksen on todettu lisäävän nAChR:ien määrää keskushermostossa *in vivo* (Marks ym. 1983). Alun perin nAChR:ien lisääntyneen määrän (upregulation) on oletettu liittyvän reseptorien epäherkistymiseen, jolloin reseptorilukumäärän lisääntyminen seurauksena nikotiinin aiheuttama nAChR-vaste välittyisi normaaliin tapaan (Dani ja Heinemann 1996). Hypoteesi on jouduttu hylkäämään, sillä nAChR:ien määrän lisääntymisessä ei ole kyetty havaitsemaan selkeää vastetta annoksen suuruuden tai antovälien kesken *in vivo* eikä *in vitro* (Rowell ja Li 1997; Whiteaker ym. 1998). Sen sijaan nikotiinin uskotaan vaikuttavan suoraan solun sisä rakenteissa, esimerkiksi Golgin laitteessa ja solulimakalvolla RNA-translaation jälkeen muokattaviin nAChR:eihin (Nashmi ym. 2003; Sallette ym. 2005; Nashmi ja Lester 2007). Rasvaliukoisena yhdisteenä nikotiini läpäisee solukalvon vapaasti ja kykenee siirtymään siten solun sisälle vaivatta. Solunsisäinen nikotiini sitoutuu solulimakalvolla rakentuviin nAChR:hin helpottaen eri alayksiköiden sitoutumista toisiinsa (Sallette ym. 2005). Näin solun sisällä muodostuvat nAChR:t rakentuvat nopeammin toimiviksi reseptoreiksi. On myös saatu viitteitä, että tällä tavoin muodostuvilla nAChR:illa olisi normaalia korkeampi affiniteetti nikotiinille (Vallejo ym. 2005). Syynä saattaa olla muun muassa muodostuvan nAChR:n alayksikkökoostumuksen muutos.

2.2 Neuronaalisten asetyylikoliinin nikotiinireseptorien alatyypit keskushermostossa

nAChR:ja ilmentyy vaihtelevasti keskushermoston eri osissa (Kuva 3) (Gotti ym. 2006). Edellä on kuvattu, miten eri alayksiköistä muodostuu toimivia reseptoripentameereja. Kuitenkin vain tiettyjen alayksiköiden on todettu pystyvän muodostamaan keskenään toimivia nAChR-alatyyppejä (Wu ja Lukas 2011). Rekombinantti-DNA-tekniikkaa hyödyntäen tutkimusryhmät ovat voineet testata erilaisten alayksikkökoostumusten ilmentymistä ja vakautta heterologisissa systeemeissä *in vitro* (Millar ja Harkness

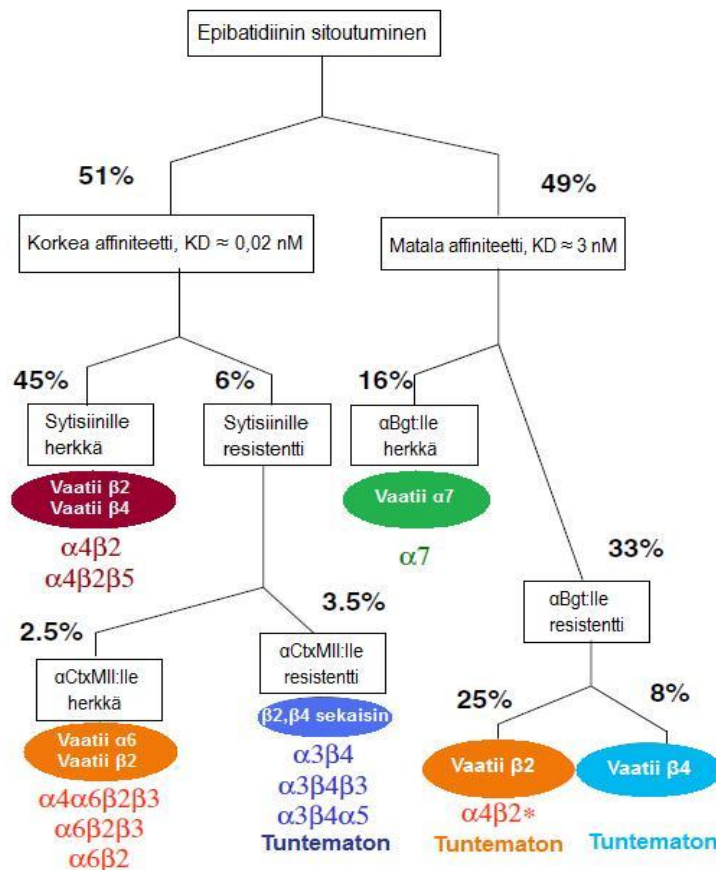
2008). *In vivo* tärkeimpänä säätelävänä tekijänä tiettyjen nAChR-alatyypin ilmentymisessä lienee, että yksittäiset hermosolut ilmentävät vain osaa nAChR-alayksiköistä keskushermoston eri osissa (Gotti ym. 2009). Myös alayksiköiden suhteellinen määrä niitä ilmentävissä hermosoluissa sekä esimerkiksi kaitsijaproteiinien vaikutus alayksiköiden rakentumiseen vaikuttavat syntyvien nAChR-alatyypin alayksikkörakenteeseen (Millar ja Harkness 2008; Gotti ym. 2009).



Kuva 3. Eräiden nAChR:ien sijainti keskeisimmissä jyrsijöiden aivojen osissa (mukaillen Gotti ym. 2009). $\alpha 7$ - ja $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR:t ovat aivojen yleisimmin esiintyviä nAChR-alatyyppejä, mutta myös muita nAChR-alatyyppejä esiintyy laajalti aivojen eri osissa.

Keskushermoston asetyylikoliinin nikotiinireseptoreita on pyritty tunnistamaan erilaisten radioleimattujen ligandien sitoutumiseen perustuvilla menetelmillä (Marks ym. 2010). α -bungarotoksiini (α -Bgt), joka on myrkkytarhakäärmeiden heimoon kuuluvien kraitien (*Bungarus*-suvun laji) tuottama hermomyrky (Young ym. 2003). Radioleimatun [125 I]- α -Bgt:n avulla voidaan tunnistaa $\alpha 7$ -nAChR:ja esimerkiksi rotan aivoista (Chen ja Patrick 1997). Vastaavasti paljon käytetty epibatidiini, jota on eristetty nuolimyrkkysammakkoihin kuuluvasta *Epipedobates tricolor*-lajin ihosta, on osoittautunut äärimmäisen voimakkaaksi nAChR-agonistiksi (Badio ja Daly 1994;

Marks ym. 2010). *Conus*-suvun merietanoiden myrkystä eristetyn α -konotoksiini MII:n (α CtxMII) avulla on puolestaan kyetty tunnistamaan $\alpha 6$ -alayksikön sisältäviä nAChR:ja (Champtiaux ym. 2003). Yleisimmillä nAChR-ligandeilla tunnistettuja, epibatidiinin sitoutumispaikkoja keskushermostossa luonnollisesti esiintyvissä nAChR-altyypeisä on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4. nAChRien karkea luokittelu epibatidiinin sitoutumisen suhteen sitoutumiskokeissa, joissa on käytetty yleisimpiä nAChR-tutkimuksissa hyödynnettyjä ligandeja (mukaillen Marks ym. 2010). α Bgt = α -bungarotoksiini, α CtxMII = α -konotoksiini MII.

2.2.1 $\alpha 4\beta 2^*$ -altyypin asetyylikoliinin nikotiinireseptorit

$\alpha 4\beta 2$ -nAChR on yksi keskushermoston yleisimmistä nAChR-altyypeistä (Kuva 3) (Wu ja Lukas 2011). Kyseistä nAChR:ia on löydetty lähestulkoon kaikilta aivoalueilta, joten reseptorilla on suuri merkitys keskushermoston toiminnan säätelyssä. $\alpha 4\beta 2$ -nAChR on yhdistetty muun muassa nikotiinin itseannosteluun, palkitseviin ominaisuuksiin ja riippuvuuteen sekä kivunlievitykseen jyrksijöillä suoritetuissa kokeissa, mutta myös

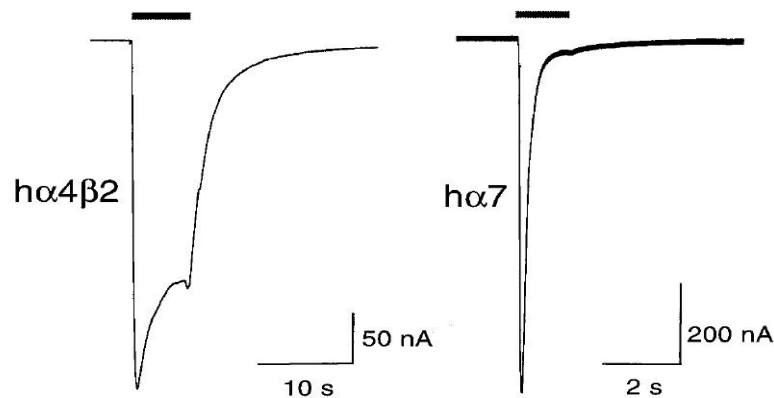
tiettyjen sairauksien kuten Alzheimerin taudin ja epilepsian patologiaan (Damaj ym. 1998; Picciotto ym. 1998; Wu ja Lukas 2011).

Heterologisilla järjestelmillä, joissa tutkittava proteiini ei ole peräisin samasta lajista kuin sitä ilmentävä solu, tehdyissä kokeissa on paljastunut, etteivät $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:t esiinny välttämättä aina samanlaisessa stoikiometrisessä muodossa. Reseptori, joka muodostuu kahdesta $\alpha 4$ -alayksiköstä ja kolmesta $\beta 2$ -alayksiköstä ($\alpha 4_2\beta 2_3$) on osoittautunut äärimmäisen herkäksi ACh:lle (Anand ym. 1991; Cooper ym. 1991). D-tubokurariinilla ja [^3H]-epibatidiinilla suoritetuissa sitoutumiskokeissa $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:n annos-vaste-kuvaajien muoto on osoittautunut kaksivaiheiseksi viitaten kahteen eri affiniteetin sitoutumiskohtaan (Zwart ja Vijverberg 1998; Marks ym. 2000). Samaan tulokseen on päädytty mittaamalla [^{35}S]-metioniinin metabolista leimautumista kanojen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:in (Nelson ym. 2003). Lisäksi $\alpha 4$ -/- ja $\beta 2$ -/- poistogeenisten hiirten aivonäytteistä tehdyissä kokeissa sekä kaksivaiheisen sitoutumisen että epibatidiinin korkean affiniteetin sitoutumiskohdan on havaittu häviävän (Picciotto ym. 2001). $\alpha 4_2\beta 2_3$ -tyypin nAChR:eilla ACh:n IC_{50} -arvot ovat noin 1 μM , kun taas matalamman affiniteetin $\alpha 4_3\beta 2_2$ nAChR-tyypillä vastaavat arvot ovat noin satakertaiset (Gotti ym. 2009). Hiiren aivoista valmistetuilla kudoshomogenaateilla suoritetuilla tutkimuksilla on saatu viitteitä, että kyseisiä matalan affiniteetin $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ja esiintyisi muun muassa isoaiivokuoren, aivoturson, talamuksen ja aivojuovion alueelle luonnostaan (Marks ym. 2006; Gotti ym. 2008; Grady ym. 2009). Heterotsygooteilla $\beta 2$ -poistogeenisillä hiirillä suoritetuissa tutkimuksissa on lisäksi saatu viitteitä, että molempia $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:n muotoja esiintyisi aivoissa luonnostaan (Marks ym. 1999). Osoittautui myös, että isoformien määrää aivoissa kyetään säätämään, joten ilmiöllä saattaa olla fysiologista merkitystä, Johtopäätöksiin päädyttiin, sillä korkean affiniteetin $\alpha 4_2\beta 2_3$ -nAChR:ien määrä väheni $\alpha 4$ -alayksikön geenin pitoisuuden ollessa alhainen. $\alpha 4_2\beta 2_3$ -nAChR:ien määrän on havaittu myös lisääntyvän suhteessa $\alpha 4_3\beta 2_2$ -nAChR:ien määrään pitkäaikaisen nikotiinialtistuksen seurauksena *in vitro* (Nelson ym. 2003).

2.2.2 $\alpha 7^*$ -alatyypin asetyylikoliinin nikotiinireseptorit

$\alpha 7$ -nAChR on $\alpha 4\beta 2$ -reseptorin ohella keskushermoston yleisimpiä nAChR-alatyyppejä (Kuva 3) (Wu ja Lukas 2011). Rottien $\alpha 7$ -nAChR:lla suoritetuissa tutkimuksissa kyseinen reseptorialatyyppi on osoittautunut reseptorikinetiikaltaan huomattavan nopeaksi, Ca^{2+} -ioneja läpäiseväksi ionikanavaksi (Séguéla ym. 1993; Peng ym. 1994). $\alpha 7$ -reseptoreja on todettu esiintyvän $\alpha 4\beta 2$ -reseptorien kaltaisesti käytännössä kaikilla aivoalueilla (Kuva 3) (Millar ja Gotti 2009; Wu ja Lukas 2011). Erityisen runsaasti $\alpha 7$ -nAChR:ja on havaittu esiintyvän aivoturson alueella, jossa reseptorialatyyppin on todettu ilmentyvän osassa GABA-välihermosoluja (Frazier ym. 1998; Zhang ja Berg 2007). Keskeisiä $\alpha 7$ -alayksikön sisältäviä nAChR:ja on todettu ilmentyvän lisäksi aivoturson ja ventraalisen tegmentaalisin alueen (VTA) glutamatergisissa hermosoluissa (Gray ym. 1996; Fabian-Fine ym. 2001; Jones ja Wonnacott 2004).

$\alpha 7$ -nAChR:t poikkeavat esimerkiksi $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:eista ionikanavan erilaisen toiminnan ja Ca^{2+} -ioniläpäisevyyden vuoksi (McGehee & Role 1996; Albuquerque ym. 2000). $\alpha 7$ -reseptorien on havaittu osallistuvan mm. välittäjäaineiden vapautumisen säätelyyn, synapsien kehittymiseen ja toiminnan ylläpitämiseen, kognitiivisen toiminnan kehittymiseen ja ylläpitoon, sekä hermosolujen elinkykyyn ja solukuolemaan (Wu ja Lukas 2011). Toiminnaltaan $\alpha 7$ -nAChR:t poikkeavat esimerkiksi $\alpha 4\beta 2$ -reseptoreista myös siten, että ne epäherkistyvät $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ja nopeammin suuren agonistipitoisuuden vallitessa (Kuva 5) (Chavez-Noriega ym. 1997; Albuquerque ym. 2000; Papke ym. 2000). Reseptori myös palautuu toimintakykyiseksi hitaammin kuin $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:t. Sen sijaan matalalla $\alpha 7$ -nAChR -agonistipitoisuudella reseptorin ei ole havaittu aktivoituvan täydellisesti eikä epäherkistyvän (Papke ym. 2000).



Kuva 5. Ihmisen $\alpha 4\beta 2$ - ja $\alpha 7$ -nAChR:ien elektrofysiologiset vasteet ACh:lle (paksu viiva vastekäyrien yläpuolella) aitokynsisammakkojen munasoluissa mitattuna (Chavez-Noriega ym. 1997). $\alpha 7$ -nAChR sekä aktivoituu että inaktivoituu äärimmäisen nopeasti verrattuna $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ään, jonka depolarisaatio voi kestää yli kymmenen kertaa kauemmin kuin $\alpha 7$:llä

$\alpha 7$ -nAChR on ainoa ihmisten keskushermostosta tunnistettu monomeerinen nikotiinireseptorialatyyppe (Drisdell ja Green 2000; Jensen ym. 2005). Yksinkertaisen rakenteensa ansiosta $\alpha 7$ -nAChR:ia on käytetty nAChR:ien rakenne-vaikutustutkimusten välineenä (Wu ja Lukas 2011). *In vitro* -kokeissa on kuitenkin saatu viitteitä, että $\alpha 7$ -alayksikkö voi muodostaa myös toimivia, heteromeerisia nAChR:ia $\beta 2$ -alayksikön kanssa (Khirough ym. 2002). Kyseistä nAChR-alatyyppeä on havaittu esiintyvän rottien aivoissa immunohistologisten värjäysten perusteella (Azam ym. 2003; Liu ym. 2009). Lisäksi rottien aivoista valmistetuilla leikkeillä suoritettujen sähkökemiallisten kokeiden tulosten perusteella on esitetty, että $\alpha 7\beta 2^*$ -nAChR:ia saattaisi esiintyä ainakin rottien etuaivojen basaaliolosissa sekä aivoturson alueella (Sudweeks ja Yakel 2000; Liu ym. 2009; Wu ja Lukas 2011). $\alpha 7\beta 2$ -nAChR on osoittautunut erityisen herkäksi Alzheimerin taudin oireita aiheuttavan β -amyloidin vaikutukselle (Liu ym. 2009). Koska etuaivojen basaalisin alue on todettu vaurioituvan Alzheimerin taudin varhaisessa vaiheessa, $\alpha 7\beta 2$ -nAChR:illa voi olla huomattava merkitys Alzheimerin taudin patogeneesissä. Lisäksi $\alpha 7$ -alayksikköjä sisältäviä nAChR:ia esiintyy muistin kannalta keskeisissä glutamatergisissa hermosoluissa. Kyseistä nAChR-alayksikköä sisältäviin nAChR:hin vaikuttavia yhdisteitä pyritäänkin kehittämään, jotta niiden poikkeavasta toiminnasta aiheutuvien tautitilojen hoitoon löydettäisiin uusia hoitomuotoja (Wallace ja Porter 2011).

2.2.3 Muita keskeisiä neuronaaalisia asetyylikoliinin nikotiinireseptorin alatyyppejä

$\alpha 4\beta 2$ - ja $\alpha 7$ -nAChR:ien lisäksi keskushermostossa esiintyy runsaasti myös muita alayksiköitä sisältäviä nikotiinireseptorialatyyppejä. Osa reseptoreista sijaitsee melko tarkasti vain tietyillä aivoalueilla, mutta jotkut alatyypeistä ilmentyvät laajalti keskushermoston eri alueilla (Millar ja Gotti 2009).

$\alpha 6$ -alayksikköjä sisältäviä nAChR:ja on havaittu esiintyvän etenkin keskiaivojen tumakkeissa ja ne osallistuvat siten keskeisesti dopaminergisen hermovälityksen säätelyyn (Millar ja Gotti 2009; Wu ja Lukas 2011). $\alpha 6$ -alayksikön lähetti-RNA:ta (mRNA) on löydetty muun muassa VTA:n ja substantia nigran (SN) dopamiinihermosoluista viitaten kyseistä alayksikköä sisältävien nAChR:ien ilmentymiseen (Kuva 3) (Klink ym. 2001; Azam ym. 2002). VTA:n GABA-hermosolujen nAChR:ien on myös havaittu ilmentävän todennäköisesti $\alpha 6\beta 2^*$ -nAChR:ja (Yang ym. 2011). Siten $\alpha 6^*$ -nAChR:t osallistuvat dopamiinin vapautumisen säätelyyn myös välillisesti lisäämällä GABA:n vapautumista VTA:lla. Lisäksi poistogeenisillä hiirillä suoritetuissa kokeissa on kyetty tunnistamaan aivojuoviossa esiintyviä, presynaptisia $\alpha 6^*$ -nAChR:ja (Salminen ym. 2004). Kyseiset reseptorit, $\alpha 4\alpha 6\beta 3\beta 2$ - ja $\alpha 6\beta 3\beta 2$ -nAChR:t säätelevät siten osaltaan dopamiinin vapautumista aivojuoviossa. $\alpha 6$ -alayksiköitä sisältävät nAChR:ien uskotaan osallistuvan tätä kautta muun muassa nikotiinin palkitsevien ominaisuuksien välitykseen, mutta myös mielihyvän ja tunnetilojen säätelyyn (Di Chiara ja Imperato 1988; Klink ym. 2001; Azam ym. 2002). Aivoalueet, joilta $\alpha 6^*$ -nAChR:ja on löydetty, vaikuttavat lisäksi yleisesti mielialan ja tarkkaavaisuuden säätelyyn sekä joidenkin neurologisten ja psykiatristen sairauksien, kuten Parkinsonin taudin ja ahdistuneisuushäiriön patologiaan (Shytle ym. 2002). Tupakoivilla havaitun nikotiinin ahdistusta lievittävän ja mielialaa tasapainottavan vaikutuksen uskotaan välittyvän ainakin osittain juuri $\alpha 6^*$ -nAChR:ien kautta.

$\alpha 3$ -nAChR alayksikkö on pääasiallinen α -alayksikkö autonomisen hermoston hermosolmuissa esiintyvissä nAChR:ssa (Papke ja Heineman 1993; Millar ja Gotti 2009). Hermosolmujen yleisimpänä nAChR:na pidetään $\alpha 3\beta 4$ -reseptoria, mutta niissä

on havaittu ilmentyvän myös muun muassa $\alpha 3\beta 2$ -nAChR:ja (Skok 2002). $\alpha 3^*$ -nAChR:t ovat osoittautuneet äärimmäisen tärkeiksi hengissä säilymisen ja normaalien elintoimintojen ylläpidon kannalta, sillä homotsygootit $\alpha 3$ -poistogeeniset hiiret kärsivät vaikeista autonomisen hermoston toimintahäiriöistä ja useat yksiköt kuolevat ensimmäisen elinviikon aikana (Xu ym. 1999). Aivoissa $\alpha 3^*$ -nAChR:t on liitetty muun muassa dopamiinin ja noradrenaliinin vapautumisen säätelyyn aivokuorella ja aivotursossa (Narik ja Wonnacott 2004; Cao ym. 2005; Löffler ym. 2006).

3 ENDOGEENINEN OPIOIDIJÄRJESTELMÄ

Opioidit ovat psykoaktiivisia yhdisteitä, jotka vaikuttavat elimistön endogeenisen opioidijärjestelmän kautta (Trigo ym. 2010). Esimerkiksi oopiumunikkoa on hyödynnetty kivun hoidossa jo tuhansia vuosia, sillä sen sisältämät alkaloidit, muun muassa morfiini, aktivoivat endogeenista opioidijärjestelmää (Brownstein 1993). Endogeeninen opioidijärjestelmä koostuu keskus- ja ääreishermostossa esiintyvistä opioidireseptoreista (Le Merrer ym. 2009). Kyseisten reseptorien luonnolliset, elimistön tuottamat ligandit ovat proteiinirakenteisia opioidipeptidejä. Näitä peptidejä tuottavien hermosolujen runko-osat sijaitsevat eri osissa keskushermostoa (Holden ym. 2005). Osa opioidipeptideistä vaikuttaa paikallisesti, osan vaikutus välittyy laajalle alueelle. Keskushermostossa opioidireseptoreja ilmentyy erityisen paljon aivokuorella, limbisen järjestelmän rakenteissa ja aivorungossa sekä selkäytimessä (Holden ym. 2005; Le Merrer ym. 2009). Keskushermostossa sijaitsevien reseptorien lisäksi opioidireseptoreja sijaitsee yleisesti myös ääreishermostossa (Holden ym. 2005). Opioidien lamauttava vaikutus esimerkiksi suolistossa on yleisesti tunnettu ääreishermoston opioidireseptorien kautta välittyvä ilmiö, joka on pystytty osoittamaan marsun suolesta valmistetuilla preparaateilla (Creese ja Snyder 1975). Opioidijärjestelmä osallistuu keskeisesti muun muassa palkitsevien tunteiden syntymiseen ja kivunlievitykseen, mutta myös oppimisen, muistin ja tunne-elämän säätelyyn (Bodnar 2011).

Elimistön opioidijärjestelmään kuuluvat reseptorit jaetaan kolmeen pääluokkaan: μ -, κ - ja δ -opioidireseptoreihin (Holden ym. 2005). Reseptorit nimettiin niiden ominaisten

ligandiensa, morfiinin, ketosyklatsosiinin ja [D-Ala²]-enkefaliinin, mukaan (Martin ym. 1976; Chang ym. 1979). Lisäksi opioidireseptoriin voidaan laskea niin kutsuttu ORL1- (opiod receptor like, opioidireseptorin kaltainen) eli nosiseptiinireseptori (Mollereau ym. 1994). Kyseisen reseptorin ligandit sekä toiminta poikkeavat kuitenkin kolmesta niin sanotusti perinteisestä opioidireseptorista. Opioidireseptorit ovat rakenteeltaan G-proteiinikytkentäisiä reseptoreja, jotka muodostuvat seitsemästä solukalvon läpäisevästä proteiinirakenteisesta laskostumasta (Law ym. 2000). Elimistön tuottamien, reseptorien luonnollisten ligandien esiasteet voidaan jakaa rakenteensa ja reseptoriselektiivisyytensä perusteella pro-opiomelanokorttiineihin (POMC), proenkefaliineihin (PENK) ja prodynorfiineihin (PDYN) (Trigo ym. 2010). Näistä sadoista aminohapoista rakentuvista proteiineista syntyy elimistön entsyymien hajottamina lyhyempiä, opioidireseptoreihin lopulta sitoutuvia polypeptidejä, kuten β -endorfiinia, enkefaliineja ja dynorfiineja.

3.1 Endogeenisen opioidijärjestelmän reseptorit

μ -, κ - ja δ -opioidireseptorit kuuluvat G_{i/o}-tyypin G-proteiinikytkentäisiin reseptoreihin (Law ym. 2000). Toiminnaltaan opioidireseptorit ovat estäviä. Reseptorien aktivoitumisen seurauksena esimerkiksi preynaptisesti vaikuttavat opioidireseptorit estävät välittäjäaineiden vapautumista synapsirakoon (MacDonald ja Nelson 1978). Sekä μ - että κ -reseptoreista on tunnistettu kolme alatyyppeä (μ 1-3 ja κ 1-3) ja δ -reseptorista kaksi alatyyppeä (δ 1-2) (Waldhoer ym. 2004). Reseptoreja esiintyy sekä presynaptisina että hermosolujen runko-osissa. Reseptorien aktivoitumisen aiheuttamia solunsisäisiä tapahtumia on selvitetty tehokkaasti *in vitro*. Reseptoriaktivaation seurauksena G-proteiinikytkentäisen reseptorin toisiolähettijärjestelmä aktivoituu, jolloin muun muassa solukalvon K⁺-kanavat avautuvat ja adenylaattisyklaasi-entsyymin sekä jänniteherkkien tyypin I_{LVA} ja I_{HVA} Ca²⁺-kanavien toiminta estyy (Sharma ym. 1977; North ym. 1987; Surprenant ym. 1990; Kasai 1992). Toisaalta ainakin δ -reseptoriaktivaation seurauksena [Ca²⁺]_i:n on havaittu lisääntyvän, mutta ilmiö ei välttämättä välity jänniteherkkien Ca²⁺-kanavien aktivoitumisen kautta (Jin ym. 1992). Lisäksi opioidireseptorien aktivoitumisen on todettu saavan aikaan MAPK-vasteen (MAPK = mitogeenin aktivoima proteiinkinasi) (Gutstein ym. 1997). Sen seurauksena

saattaa välittyä osa opioidien positiivista vaikutuksista, mutta mahdollisesti myös osa niiden haittavaikutuksista.

μ -reseptoria pidetään opioidijärjestelmän merkittävimpana reseptorityyppinä, sillä kyseisten reseptorien on pääasiassa todettu vastaavaan kliinisessä käytössä olevien opioidien analgeettisesta sekä riippuvuutta ja mielihyvää aiheuttavasta vaikutuksesta (Matthews ym. 1996). μ -reseptoria esiintyy laajalti keskushermostossa niin aivoissa kuin selkäytimessä (Le Merrer ym. 2009). Erityisen runsaasti μ -reseptoreja on havaittu esiintyvän mantelitumakkeen, talamuksen sekä keskiaivojen ja aivorungon tumakkeiden alueilla sekä selkäytimessä. Reseptori on siten vallitseva opioidireseptori kivun tuntemuksesta vastaavilla somatosensorisilla alueilla. Toisaalta keskushermoston μ -reseptorien kautta välittyvät myös monet opioidien haitallisista vaikutuksista. Esimerkiksi aivorungon alueen hengitystä säätelevien tumakkeiden toiminta vaimentuu hermosoluissa esiintyvien μ -reseptorien aktivaation seurauksena, jonka seurauksena esiintyy annosriippuvaisesti hengityslamaa (Metcalf ym. 1979; May ym. 1989).

δ -opioidireseptorit ovat toiminnaltaan μ -reseptorien kaltaisia (Holden ym. 2005). δ -reseptori on liitetty esimerkiksi opioidien kipua lievittävään vaikutukseen, mutta se ei todennäköisesti aiheuta hengityslamaa μ -reseptorin tavoin (Chevillard ym. 2010). δ -reseptoria on havaittu esiintyvän erityisen runsaasti aivokuorella, mantelitumakkeen alueella, aivojuoviossa sekä hajuhieron alueilla, mutta kuitenkin rajallisemmin suhteessa muihin opioidireseptoreihin (Le Merrer ym. 2009). δ -reseptori on liitetty myös mielialan säätelyyn: δ -reseptorin suhteen poistogeeniset hiiret ovat villittyypin hiiriä ahdistuneempia ja masentuneempia (Filliol ym. 2000).

κ -reseptorit ovat kolmas keskeisistä opioidireseptorien alaryhmistä (Holden ym. 2005). Reseptoria on havaittu esiintyvän muun muassa hypothalamuksen, aivojuovion, aivolisäkkeen sekä etuaivojen pohjan ja aivoturson alueella (Le Merrer ym. 2009). κ - ja μ -reseptoreja ilmentyy osittain samoilla aivoalueilla. κ -reseptoreja pidetään monella tavalla μ - ja δ -reseptoreista poikkeavina toimintansa vuoksi. Erityisen keskeistä on, ettei κ -reseptoriaktivaatio ei saa aikaan mielihyvän tunnetta vaan päinvastaista, epämiellyttävää tunnetta (dysforiaa) (Pfeiffer ym. 1986). Syy opioidireseptorien

erilaiseen vasteeseen johtuu niiden sijainnista. κ -reseptoreja ilmentyy keskushermostossa alueilla, joilla hermosolujen toiminnan estyminen saa aikaan epämiellyttävien tunteiden esiintymistä (Mansour ym. 1987). Esimerkiksi stressin aiheuttaman epämiellyttävän olon on havaittu välittyvän juuri κ -reseptorien kautta (Land ym. 2008). κ -reseptorien rooli kivunlievityksessä on ristiriitainen, sillä perinteisesti κ -reseptorien aktivoitumista ei ole yhdistetty opioidien aikaansaamaan kivunlievitykseen. On kuitenkin havaittu, että κ -reseptoreja aktivoivat yhdisteet saattavat olla μ -reseptoreja aktivoivia yhdisteitä tehokkaampia neuropaattisen kivun hoidossa (Przewlocki ja Przewlocka 2001; Gavériaux-Ruff ja Kieffer 2002; Xu ym. 2004). κ -reseptorien lisääntynyt toiminta on yhdistetty myös epilepsiaan (Houser ym. 1990; Loacker ym. 2007). Kyseisiä reseptoreja on lisäksi havaittu ilmentyvän erityisen runsaasti aivoturson alueella, jossa ne osallistunevat muistin ja oppimisen säätelyyn (Jiang ym. 1989; Daumas ym. 2007).

3.2 Endogeeniset opioidipeptidit

Elimistön opioidijärjestelmää aktivoivia, endogeenisiä yhdisteitä kutsutaan opioidipeptideiksi (Trigo ym. 2010). Yhdisteisiin kuuluu useita erilaisia aminohapoista rakentuvia polypeptideitä. Peptidit syntyvät elimistön entsyymien hajottaessa suurempia prekursoriproteiineja pienemmiksi polypeptideiksi (Kieffer ja Gavériaux-Ruff 2002). Varsinaisesti reseptorien kautta vaikuttavien opioidipeptidien esiasteet ovat pro-opiomelanokortiini (POMC), proenkefaliini (PENK) ja prodynorfiini (PDYN) (Trigo ym. 2010). Vaikka näistä esiasteista muodostuu keskenään hyvin erilaisia pienempiä opioidipeptidejä, joiden farmakodynamiikka poikkeaa toisistaan, sisältävät kaikki opioidireseptorivaikutuksen kannalta keskeisen neljän aminohapon (Tyrosiini-Glysiini-Glysiini-Fenyylialaniini) jakson N-terminaalissa päässään (Mansour ym. 1995). Keskeisimmät opioidipeptidit on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Keskeisimpien endogeenisten opioidipeptidien aminohappojärjestys (mukaillen The Opiate Receptors 2011). Ala = Alaniini, Arg = Arginiini, Asn = Asparagiini, Gln = Glutamiini, Glu = Glutamaatti, Gly = glysiini, Ile = Isoleusiini, Leu = Leusiini, Lys = Lysiini, Met = Metioniini, Pro = Prolini, Ser = Seriini, Phe = Fenyylialaniini, Thr = Treoniini, Tyr = Tyrosiini, Val = Valiini

| Pro-opiomelanokorttiin johdannaiset | |
|--|---|
| β -endorfiini 1-26 | Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala |
| β -endorfiini 1-27 | Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr |
| β -endorfiini 1-31 | Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu |
| Pro-enkefaliinin johdannaiset | |
| Leu-enkefaliini | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu |
| Met-enkefaliini | Tyr-Gly-Gly-Phe-Met |
| Pro-dynorfiinin johdannaiset | |
| α -dynorfiini | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro |
| β -dynorfiini | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys |
| Dynorfiini A8 | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile |

3.2.1 Pro-opiomelanokorttiin johdannaiset

POMC toimii β -endorfiinien esiasteena (Le Merrer ym. 2009). β -endorfiineihin kuuluu ainakin kolme eripituista polypeptidiä, joissa on joko 26, 27 tai 31 aminohappoa (Taulukko 1). Siten ne ovat molekyyllipainoltaan suurimpia endogeenisiä opioidipeptidejä. POMC:a on havaittu erittyvän runsaimmin aivolisäkkeessä (Akil ym. 1984). Vastaavasti β -endorfiineja on todettu esiintyvän eniten hypotalamuksen alueella. POMC:a on havaittu ilmentyvän myös monissa hermokudokseen kuulumattomissa elimissä, kuten ihossa, kilpirauhasessa, haimassa, kiveksissä, istukassa ja munuaisissa (Akil ym. 1984; Smith ja Fundrell 1988; Bicknell 2008). Lisäksi POMC:a on löydetty myös immuunijärjestelmään kuuluvista soluista, kuten imusoluista ja makrofageista. Toistaiseksi POMC:n ja siitä syntyvien β -endorfiinien rooli näissä kudoksissa on

tuntematon, mutta niiden uskotaan osallistuvan osaltaan ainakin immuunijärjestelmän säätelyyn (Wiksberg ym. 2000). β -endorfiinin vaikutus välittyy ainakin immuunijärjestelmän soluissa muiden kuin perinteisten opioidireseptorien kautta (Navolotskaya ym. 2001). Keskushermostossa β -endorfiineilla on kuitenkin toisistaan poikkeavia vaikutuksia, sillä 31 aminohappoa pitkä β -endorfiini 1-31 toimii μ - ja heikommin δ -reseptoriagonistina, mutta lyhyempi β -endorfiini 1-27 toimii näiden reseptorien antagonistina (Hammonds ym. 1984; Trigo ym. 2010).

3.2.2 Pro-enkefaliinin johdannaiset

PENK toimii [metioniini]-enkefaliinin (Met-enkefaliini) ja [leusiini]-enkefaliinin (Leu-enkefaliini) esiasteena (Le Merrer ym. 2009). Met- ja Leu-enkefaliini muodostuvat viidestä aminohaposta (Tyrosiini-Glysiini-Glysiini-Fenyyialaniini-Metioniini/Leusiini) eivätkä siis poikkea toisistaan viimeistä aminohappoa lukuun ottamatta (Taulukko 1). Ne ovat siten rakenteeltaan yksinkertaisimpia endogeenisiä opioidipeptidejä. PENK:sta on havaittu pilkkoutuvan myös pidempiä polypeptidejä, joiden farmakologinen profiili poikkeaa jossain määrin Met- ja Leu-enkefaliineista. PENK:a sekä Met- ja Leu-enkefaliineja on todettu ilmentyvän laajalti aivojen ja selkäytimen alueella, ja sen on havaittu olevan yleisimmin ilmentyvä endogeenisten opioidipeptidien prekursori (Akil ym. 1984; Harlan ym. 1987). Spesifisiä vasta-aineita käyttämällä on saatu selville, että PENK osallistuu hermosolujen toiminnan säätelyyn muun muassa aivoalueilla, jotka vastaavat ekstrapyramidaalisista motorisista toiminnoista, kipuaistimuksesta sekä sydän- ja verisuonijärjestelmän toiminnasta (Le Merrer ym. 2009). Met- ja Leu-enkefaliini sitoutuvat kolmesta keskeisimmästä opioidireseptorista voimakkaimmin δ -opioidireseptoriin – sitoutumisvoimakkuuden δ -reseptoriin on havaittu olevan jopa 20-kertainen μ -reseptoriin verrattuna (Trigo ym. 2011).

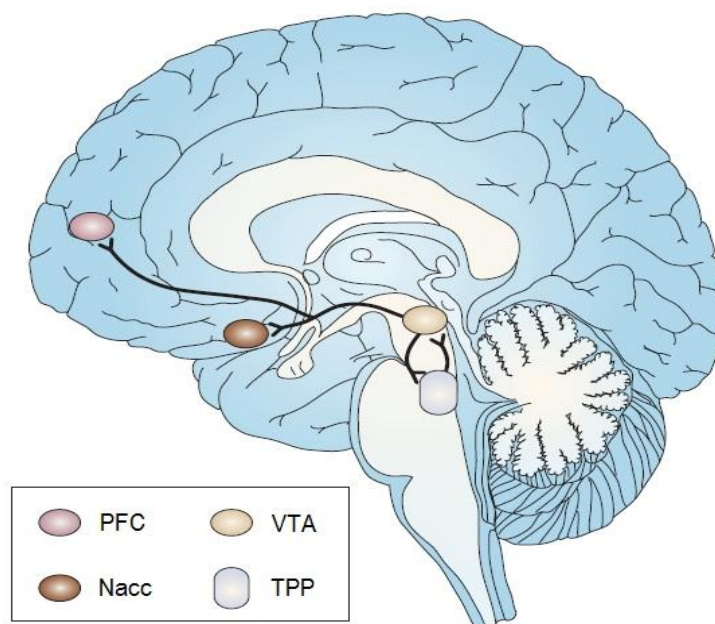
3.2.3 Pro-dynorfiinin johdannaiset

PDYN toimii dynorfiinien, muun muassa α - ja β -dynorfiinien esiasteina (Le Merrer ym. 2009). PDYN:n sisältää kolme Leu-enkefaliinijaksoa ja dynorfiini-polypeptidien N-terminaalinen pää on identtinen Leu-enkefaliinin kanssa (Taulukko 1). Dynorfiinit ovat

kuitenkin enkefaliineja suurempia molekyyliä, sillä ne koostuvat noin kymmenestä aminohaposta. Ei ole myöskään pystytty osoittamaan, että PDYN:stä muodostuisi Leu-enkefaliinia. Dynorfiineja on havaittu ilmentyvän joitain poikkeuksia lukuun ottamatta samoilla aivoalueilla kuin enkefaliineja (Akil ym. 1984). Siten dynorfiineja esiintyy erittäin laajoilla keskushermoston alueilla, muun muassa isoaivojen kuorikerroksessa, aivojuoviossa sekä selkäytimen takasarvessa, mutta erityisen paljon aivoturson alueella. Dynorfiinit ovat endogeenisista opioidipeptideistä voimakkaimmin κ -reseptoreja aktivoivia yhdisteitä (Trigo ym. 2010). Siksi niiden erityisen runsas esiintyminen juuri aivotursossa, jossa on havaittu ilmentyvän huomattavan suuri määrä κ -reseptoreja, ei tule yllätyksenä. Dynorfiineilla saattaa siten olla suuri merkitys Alzheimerin taudin synnyssä, sillä dynorfiinien pitoisuuden on havaittu lisääntyneen taudin potilailla (Mathieu-Kia ym. 2001).

4 NIKOTIINI, OPIOIDIT JA LÄÄKEAINERIIPPUVUUS

Elimistön kolinerginen hermojärjestelmä ulottuu laaja-alaisesti keskushermoston eri osiin (Dani ja Bertrand 2007). Järjestelmän rooli eri välittäjäaineiden säätelyssä on tunnettu ja hyvin ymmärretty. Koska myös endogeeniseen opioidijärjestelmään kuuluvia reseptoreja ja järjestelmän kautta vaikuttavia endogeenisiä ligandeja ilmentyy eri puolilla keskushermostoa, ei ole yllättävää, että näiden kahden järjestelmän välillä on havaittu päällekkäisyyksiä (Tanda ja Di Chiara 1998; Berrendero ym. 2002). Sekä kolinergisen hermojärjestelmän että endogeenisen opioidijärjestelmän kautta vaikuttavien yhdisteiden, kuten nikotiinin ja heroinin, on tiedetty pitkään aiheuttavan käyttäjilleen riippuvuutta. Lääkeaineriippuvuudessa on perimmiltään kyse aivojen kroonisesta häiriötilasta. Riippuvuuteen liittyy haitallisen yhdisteen käyttö riippumatta niiden haitallisista vaikutuksista, yhdisteen käytön lopettamisesta seuraavat vieroitusoireet ja yhdisteen väärinkäytön jatkuminen pitkän tauon jälkeen eli relapsi. Tutkimuksissa onkin saatu vahvoja viitteitä endogeenisen opioidijärjestelmän ja kolinergisen järjestelmän päällekkäisyydestä riippuvuuden synnyssä ja ylläpidossa mesolimbisen dopamiinijärjestelmän aktivoitumisen seurauksena (Kuva 6) (Tanda ja Di Chiara 1998; Maisonneuve ja Glick 1999; Isola ym. 2009).



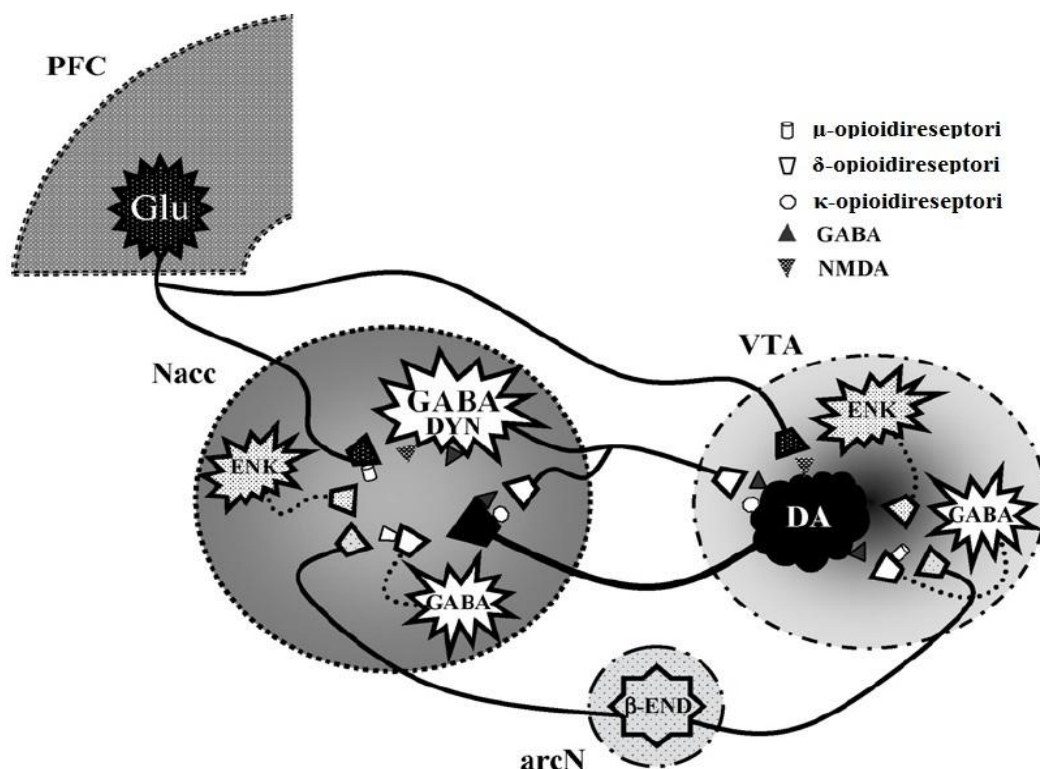
Kuva 6. Mesolimbinen ja mesokortikaalinen dopamiinirata (mukaillen Laviolette ja van der Kooy 2004). Molemmat hermoradat saavat alkunsa ventraaliselta tegmentaaliselta alueelta (VTA), josta hermoradat heijastuvat accumbens-tumakkeeseen (Nacc) (mesolimbinen rata) ja otsalohkon aivokuoreen (prefrontal cortex, PFC) (mesokortikaalinen rata). VTA:lta saa alkunsa myös hermorata tegmentaalisesta pedunkulopontiiviseen tumakkeeseen (tegmental pedunculopontine nucleus, TPP)..

4.1 Opioidit ja riippuvuus

Elimistön opioidijärjestelmää aktivoivat yhdisteet aiheuttavat käyttäjilleen euforisen hyvänolon tunteen, jonka vuoksi niiden käyttöön liittyy riippuvuuden ja väärinkäytön riski (Trigo ym. 2010). Opioidien aiheuttaman euforisen tunteen syntymekanismi perustuu keskiaivoista VTA:lta akkumbens-tumakkeeseen kulkevan mesolimbisen dopamiiniradan aktivoitumiseen (Kuva 6) (Trigo ym. 2010). Esimerkiksi elimistöön annosteltu, voimakkaasti riippuvuutta aiheuttava heroiini aktivoi kyseisen hermoradan dopaminergisia hermosoluja (Kuva 7) (Stinus ym. 1980; Stinus ym. 1992). Dopamiinin lisääntyneen vapautumisen näistä hermosoluista on havaittu välittyvän postsynaptisten μ - ja δ -reseptorien aktivoitumisen seurauksena *in vivo* (Kuva 7) (Hirose ym. 2005). μ -reseptorien on kuitenkin todettu välittävän pääasiallisesti opioidien palkitsevia vaikutuksia (Chefer ym. 2003). Presynaptisten μ -reseptorien aktivoitumisen on lisäksi todettu vähentävän GABA:n vapautumista VTA:n GABA-välineuroneista, jolloin dopamiinin vapautuminen lisääntyy entisestään (Bonci & Williams 1997). δ -reseptorien

aktivaation on samoin todettu estävän presynaptisesti GABA-välineuronien toimintaa Nacc:ssa (Hoffman ja Lupica 2001). Endogeenisistä opioidipeptideistä met- ja leu-enkefaliilinit estävät δ -reseptorien aktivoitumisen kautta GABA:n vapautumista paikallisesti Nacc:ssa, jolloin dopamiinihermosoluihin kohdistuva GABA:n estävä vaikutus heikkenee (Kuva 7) (Trigo ym. 2010). μ -reseptoreja pääasiallisesti aktivoivat β -endorfiinit puolestaan estävät GABA:n vapautumista VTA:lla lisäten siten paikallisesti dopamiinin vapautumista (Kuva 7). Lisäksi μ -reseptoriaktivaatio heikentää isoaivojen otsalohkon tumakkeiden tuottaman glutamaatin vapautumista ainakin VTA:lla ja todennäköisesti myös Nacc:ssa, jolloin GABA-hermosolujen aktivoituminen heikentyy myös tällä aivoalueella dopamiinin vapautumista lisäten (Kuva 7) (Margolis ym. 2005; Trigo ym. 2010).

Voimakkaimmat riippuvuutta aiheuttavat opioidit aktivoivat pääasiassa μ -reseptoreja *in vivo* (Devine ja Wise 1994). Nacc:ssa on havaittu ilmentyvän myös κ -opioidireseptoreja (Chefer ym. 2005). Lisäksi Nacc:ssä on havaittu olevan runsaasti dynorfiineja erittäviä hermosoluja (Svingo ym. 1999). μ - ja δ -reseptoriaktivaatiosta poiketen κ -reseptoriaktivaation on todettu nostavan dopamiinihermosolujen aktivoitumiskynnystä (Todtenkopf ym. 2004). Näin ollen κ -reseptoriagonistit eivät aiheuta euforiaa vaan vaikeuttavat hyvän olon tuntemista tätä kautta.



Kuva 7. Kaavamaisesti esitetty kuva endogeenisen opioidijärjestelmän osallisuudesta dopamiinin vapautumisen säätelyssä VTA:lla ja Nacc:n kuorikerroksessa (mukaillen Trigo ym. 2010). Sekä VTA:lla että Nacc:llä sijaitsee enkefalinergisiä välineuroneita (ENK), jotka osallistuvat muun muassa glutamaatin (Glu) ja GABA:n vapautumisen säätelyyn δ-opioidireseptorien kautta, helpottaen lopulta dopamiinin (DA) vapautumista. Hypotalamuksessa sijaitsevassa kaaritumakkeessa (nucleus arcuate, arcN) esiintyvistä β-endorfinergisistä hermosoluista (β-END) lähtevät hermoradat kulkeutuvat VTA:lle ja Nacc:lle. β-endorfiini helpottaa osaltaan dopamiinin vapautumista vähentäen muun muassa GABA:n vapautumista GABAerigisistä hermopäätteistä μ-reseptorivälitteisesti. Nacc:n dynorfinergiset hermosolut (DYN) puolestaan vähentävät vaputuvan dopamiinin määrää κ-reseptorivälitteisesti. GABA = γ-aminovoihappo, Nacc = Accumbensin tumake, NMDA = N-metyyli-D-asparagiinihappo, PFC = etuotsalohkon kuorikerros, VTA = ventraalinen tegmentaalin alue

4.2 Nikotiini ja riippuvuus

Tupakointia pidetään eräänä merkittävimpänä ennenaikaista kuolemaa aiheuttavana tekijänä länsimaissa (Mathers ja Loncar 2006). Tupakkakasvin (*Nicotina tabaccum*) sisältämä, kasvin aineenvaihduntatuotteena syntyvä alkaloidirakenteinen nikotiini on tupakan sisältämistä yhdisteistä voimakkaimmin riippuvuutta aiheuttava (Benowitz 2009). Nikotiinin riippuvuutta aiheuttava ominaisuus välittyy mesolimbisen dopamiinijärjestelmän aktivoitumisen kautta (Benwell ja Balfour 1992, Lecca ym.

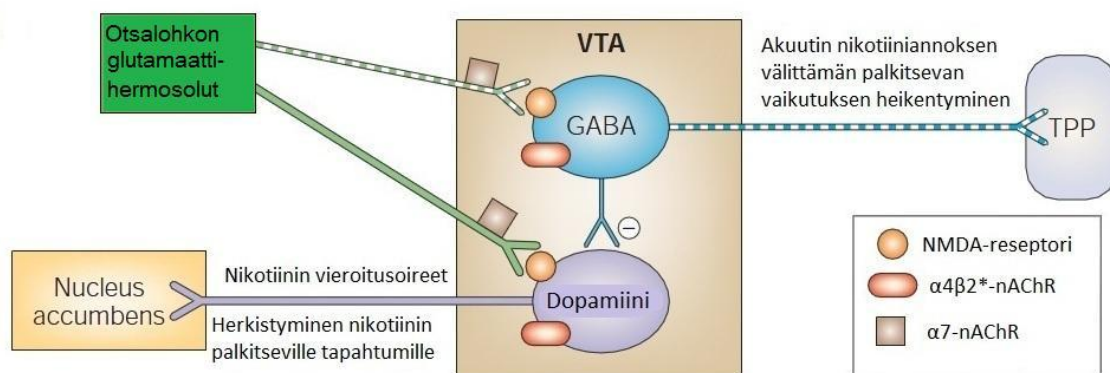
2006). Nacc:n kuorikerroksessa dopamiinia voi vapautua joko nikotiinin suorasta vaikutuksesta tai VTA:lta saapuvien dopaminergisten heijasteiden aktivoimana. VTA:n dopaminergisissä hermosoluissa on havaittu ilmentyvän ainakin $\alpha 4\beta 2^*$ - ja $\alpha 7$ -alatyypin nAChR:ja, Nacc:n kuorikerroksella lisäksi ainakin $\alpha 6\beta 2^*$ -nAChR:ja (Gotti ym. 2009; Perez ym. 2012).

VTA:lla dopamiinin vapautumisen lisääntyminen johtuu nikotiinin vaikutuksesta sekä dopaminergisiin että GABAergisiin hermosoluihin (Kuva 8) (Laviolette ja van der Kooy 2004). VTA:lla esiintyy runsaasti nAChR:ja, sillä kolinerginen hermojärjestelmä vaikuttaa suoraan VTA:n dopaminergisiin hermosoluihin (Omalchenko ja Sesack 2005). Kolinergiset hermoradat saavat alkunsa läheiseltä TPP:ltä (Kuva 8). Dopaminergiset hermosolut aktivoituvat normaalitilanteesta spontaanisti tasaisin väliajoin, mutta nikotiinin vaikutuksesta reseptorien aktivoituminen voimistuu ja aktivaatio kestää pidempään (Zhang ym. 2009). Aktivoitumisen voimistumista tapahtuu samalla nikotiinipitoisuudella, joka voidaan mitata plasmasta savukkeen polttamisen jälkeen (Pidoplichko ym. 1997, Zhang ym. 2009). Ilmiön on havaittu välittyvän *in vivo* ainakin $\alpha 4\beta 2$ - ja $\alpha 4\alpha 6\beta 2$ -nAChR:ien kautta (Pons ym. 2008). VTA:n dopaminergisten hermosolujen aktivoitumisen voimistuminen ei kuitenkaan välitä akuutin nikotiiniannoksen palkitsevia vaikutuksia (Laviolette ja van der Kooy 2003; Laviolette ym. 2003). Tällaisessa tilanteessa nikotiinin palkitsevat vaikutukset välittyvät $\alpha 7$ -nAChR:n välittämän TPP:n ja GABA-aktivaation kautta, kun taas dopaminergisten hermosolujen aktivoituminen välittää nikotiinin vastenmielisiä vaikutuksia (Kuva 8).

Vaikka akuutin nikotiiniannoksen seurauksena VTA:n ja Nacc:n lisääntynyt dopamiinin vapautuminen ei välitä nikotiinin palkitsevia vaikutuksia, pidetään lisääntyntä dopamiinin vapautumista tärkeimpänä muutoksena pitkäaikaista nikotiinialtistusta seuraavassa riippuvuudessa (Robinson ja Berridge 2001). Pitkäaikaisen nikotiinialtistuksen seurauksena VTA:n ja Nacc:n dopaminerginen järjestelmä herkistyy (Benwell ja Balfour 1992). Tämän seurauksena nikotiinin välittämät palkitsevat tapahtumat muuttuvat halutuiksi (englanniksi incentive salience) (Robinson ja Berridge 2001). Järjestelmän herkistyessä dopamiinireseptorien (Le Foll ym. 2003) ja myös nAChR:ien (Mansvelder ym. 2002) ilmentyminen VTA:lla lisääntyy.

Pitkäaikaisen nikotiinialtistuksen seurauksena tapahtuu muutoksia myös VTA:n GABA-hermosolujen toiminnassa (Mansvelder ym. 2002). GABA-hermosolujen toimintaa VTA:lla säätelevät pääasiassa $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR:t (Gotti ja Clementi 2004). Ne epäherkistyvät pitkäaikaisessa nikotiinialtistuksessa, jolloin nikotiini ei enää kykene aktivoimaan reseptoreja (Mansvelder ym. 2002). Tällöin GABA-hermosolujen aktivaatio vähenee, jolloin glutamaatin rooli VTA:n dopamiinihermosolujen toiminnan säätelyssä

korostuu (Kuva 9). Glutamatergisten hermosolujen viejähaarakkeissa, joiden päätealue on VTA:lla, sijaitsee presynaptisesti $\alpha 7$ -nAChR:ja (Gotti ja Clementi 2004). $\alpha 7$ -nAChR:t eroavat toiminnaltaan $\alpha 4\beta 2$ -reseptoreista: epäherkistyäkseen ne vaativat $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ja suuremman nikotiinipitoisuuden (Woollorton ym. 2003). Tupakanpolton seurauksena plasman nikotiinipitoisuus nousee riittäväksi $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ien epäherkistymiseksi, muttei riittävästi $\alpha 7$ -nAChR:ien epäherkistymiseen. Lisääntyneen glutamaattireseptorien aktiivisuuden seurauksena VTA:n dopamiinihermosolujen aktivoituminen voimistuu. Tästä johtuen Nacc:n kuorikerroksessa vapautuvan dopamiinin määrä lisääntyy.



Kuva 9. Pitkäaikaisen nikotiiniannon vaikutus VTA:n dopaminergisiin hermosoluihin (mukaillen Laviolette ja van der Kooy 2004). $\alpha 7$ -nAChR:t eivät epäherkisty $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR:ien tavoin tupakasta saatavilla nikotiinipitoisuuksilla, jolloin GABA-hermosolujen dopaminergisiin hermosoluihin kohdistuva, dopamiinin vapautumista jarruttava vaikutus vähenee. Toisaalta glutamaatin lisääntynyt vapautuminen isoajvojen otsalohkon alueelta lisääntyy $\alpha 7$ -nAChR aktivaation kautta. Tämän seurauksena dopamiinin vapautuminen Nacc:n kuorikerrokselle saa aikaan nikotiinin palkitsevat vaikutukset; vastaavasti nikotiinin vieroitusoireet välittyvät samaa kautta, kun dopamiinia ei vapaudu totuttuun tapaan. NMDA = N-metyyli-D-asparagiinihappo TPP = Tegmentaalinen pedunkulopontiivinen tumake, VTA = Ventraalinen tegmentaalin alue

4.3 Nikotiinin ja opioidien interaktiot riippuvuudessa

Kuten edellä on mainittu, sekä nikotiini että opioidit aiheuttavat käyttäjilleen riippuvuutta samalla mekanismilla eli lisäämällä dopamiinin vapautumista Nacc:n kuorikerroksessa (Stinus ym. 1980; Stinus ym. 1992; Benwell ja Balfour 1992). On havaittu, että valtaosa opioidien väärinkäyttäjistä ja korvaushoitoa saavista tupakoi (Elkader ym. 2009; Pajusco ym. 2012). Interaktion neurofysiologista taustaa on pyritty

selvittämään niin *in vivo* kuin *in vitro*. Nikotiinin ja opioidien interaktioita on tutkittu vain vähän *in vitro*, mutta julkaistut tutkimukset antavat kuitenkin arvokasta tietoa, joka yhdistettynä *in vivo* -tutkimuksiin valottaa ymmärrystä nikotiinin ja opioidien yhteisvaikutuksista ja niiden mahdollisesta hyödyntämisestä tai välttämisestä.

Nikotiini lisää endogeenisten opioidien vapautumista aivoissa (Dhatt ym. 1995; ym 2009). Myös endorfiinien esiasteen, PENK:n vapautumisen on havaittu lisääntyvän nikotiinin vaikutuksesta keskiaivoissa, yhdisteen palkitsevia vaikutuksia ja riippuvuutta välittävillä aivoalueilla (Dhatt ym. 1995, Houdi ym. 1998). Plasman β -endorfiinin pitoisuuden on niin ikään todettu nousevan tupakoijilla (del Arbol ym. 2000). Ilmiöllä ei kuitenkaan liene vaikutusta keskushermoston opioidijärjestelmän toimintaan, vaan sen uskotaan olevan ennemminkin elimistön vaste tupakoinnista aiheutuvalle stressille keskushermoston ulkopuolella (Berrendero ym. 2010). Suurikokoiset opioidipeptidit eivät lisäksi kykene läpäisemään veri-aivoestettä.

Eläinkokeissa on havaittu, että nikotiinin palkitsevat vaikutukset välittyvät ainakin osittain endogeenisen opioidijärjestelmän aktivoitumisen kautta. μ -reseptoriaktivaation on todettu säätelevän dopamiinin vapautumista VTA:n dopaminergisista hermosoluista Nacc:n kuorikerrokselle akuutin nikotiinin annon seurauksena (Tanda ja Di Chiara 1998). Lisäksi μ -reseptoriantagonisti ja κ -reseptoriagonisti syklatsoinin on havaittu estävän nikotiinin stimuloiman dopamiinin vapautumisen Nacc:n kuorikerroksessa (Maisonneuve ja Glick 1999). Jyrsijöillä suoritetuissa käyttäytymiskokeissa nikotiini aiheuttaa opioidien tavoin ehdollistettua paikkahakuisuutta, joka on koeasetelmana yleisesti käytetty ja luotettavana pidetty menetelmä yhdisteiden riippuvuuden aiheuttamisen tutkimisessa (Vastola ym. 2002). Nikotiinin aikaansaaman ehdollistetun paikkahakuisuuden on todettu heikkenevän μ -reseptorin suhteen poistogeenisillä hiirillä (Berrendero ym. 2002). Lisäksi nikotiinin ehdollistettu paikkahakuisuus häviää hiiriltä, joiden β -endorfiinigeeni on poistettu (Trigo ym. 2009). Sama vaikutus ilmenee μ - ja κ -reseptoriantagonisti naltreksonia saaneilla rotilla (Liu ym. 2009). Naltreksonin ei sen sijaan ole havaittu vaikuttavan nikotiinin itseannosteluun rotissa (Corrigall ja Coen 1991; Liu ym. 2009). Naloksonin vaikutuksesta nikotiinin itseannosteluun on saatu ristiriitaisia tuloksi: joissain tutkimuksissa sillä ei naltreksonin tavoin ole ollut

vaikutusta, toisissa tutkimuksissa se on selvästi vähentänyt nikotiinin itseannostelua (DeNoble ja Mele 2006; Ismayilova ja Shoaib 2010). Poikkeavat vasteet saattavat johtua käytettyjen käyttäytymismallien eroista. Endogeenisella opioidijärjestelmällä saattaa olla merkittävä rooli pitkäaikaisen nikotiinialtistuksen seurauksena syntyvässä riippuvuudessa, jota ehdollistettu paikkahakuisuus käyttäytymiskokeena kuvastaa (Liu ym. 2009). Sen sijaan akuutin nikotiiniannoksen aikaansaamassa palkitsevassa olotilassa, jota itseannostelukoe kuvaa, opioidijärjestelmän rooli lienee vähäisempi. Näytön perusteella on todennäköistä, että ainakin μ -reseptorit osallistuvat nikotiinin palkitsevien ominaisuuksien säätelyyn. On toistaiseksi kuitenkin epäselvää, missä määrin ja millä laajuudella endogeeninen opioidijärjestelmä lopulta osallistuu nikotiinin palkitsevien vaikutusten syntyyn.

Naltreksonin on todettu *in vitro* estävän solujen kalvojännitteen muuttumista positiivisemmaksi elektrofysiologisin menetelmin mitattuna ja siten hillitsevän nAChR-aktivaatiota (Madsen ja Albuquerque 1985). Rotan aivotursosta eristetyissä hermosoluissa naltreksonin on havaittu estävän kilpailemattomasti ainakin $\alpha 7$ - ja $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ja (Almeida ym. 2000). Myös naloksoni on osoittautunut kilpailemattomaksi nAChR-antagonistiksi naudan lisämunuaisytimen soluissa (Tomé ym. 2001). Sekä naloksonin että naltreksonin on havaittu toimivan myös ihmisen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR-estäjinä SH-EP1-h $\alpha 4\beta 2$ -solulinjalla suoritetuissa $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtauskokeissa ja kalsiumfluorometrialla mitattuna (Talka ym. julkaisematon havainto 2012). Saadut tulokset tukevat osaltaan ajatusta opioidiantagonistien käytöstä nikotiiniriippuvuuden hoidossa.

Nikotiinin ja kolinergisen hermojärjestelmän onkin todettu osallistuvan morfiinin palkitsevien vaikutusten voimistumiseen hiirillä suoritetussa ehdollistetun paikkahakuisuuden kokeessa (Rezayof ym. 2006). Vaikka ehdollistettua paikkahakuisuutta pidetään eräänä parhaista yhdisteiden palkitsevien vaikutusten tehoa mittaavista koejärjestelyistä, siihen liittyy myös koe-eläimen kyky oppia ja muistaa ympäristö, jossa palkitsevat tuntemukset syntyvät (Ferbintenu ja McDonald 2001). Keskiaivoissa sijaitseva aivoturso on keskushermoston tärkeimpiä alueita muistin ja oppimisen kannalta ja sillä on todettu sijaitsevan runsaasti nAChR:ja (Ferbintenu ja

McDonald 2001; Gotti ym. 2006). Pitkäaikaisen nikotiinialtistuksen on havaittu voimistavan morfiinin vaikutusta hiirillä samassa koejärjestelyssä (Vihavainen ym. 2008a). Niin ikään asetyylikoliiniesteraasin estäjä fysostigmiinin on todettu voimistavan morfiinin aiheuttamaa ehdollistettua paikkahakuisuutta, kun taas nAChR-antagonisti mekamyylamiinin on havaittu heikentävän sitä (Rezayof ym. 2006). Ainakin $\alpha 4\beta 2$ - ja $\alpha 7$ -nAChR:t osallistuvat morfiinin palkitsevan vaikutuksen voimistumiseen (Feng ym. 2011). On siis mahdollista, että tutkittaessa nikotiinin ja opioidien interaktioita osa lisääntyneestä paikkahakuisuudesta välittyy jyrksijöillä nAChR-aktivaatiota seuraavan parantuneen oppimisen kautta. Ehdollistetun paikkahakuisuuden lisäksi pitkäaikaisesti nikotiinille altistettujen hiirten on todettu herkistyvän morfiinin aikaansaamalle dopamiinin vapautumiselle VTA:lla (Vihavainen 2008b). Ilmiö välittyy GABA-välineuronien toiminnan vaimentumisen kautta, kun kyseisissä hermosoluissa esiintyvät GABA:n vapautumista säätelevät nAChR:t epäherkistyvät.

Useimmissa tapauksissa nikotiinin ja opioidien interaktion mekanismi on nAChR-antagonismi. Sen sijaan nikotiinin yhteisvaikutuksista kodeiinin ja morfiinin kanssa on saatu mielenkiintoisia ja jopa yllättäviä tuloksia *in vitro*. Rotan lisämunuaisytimen kasvaimesta eristetyillä PC12-soluissa suoritetuissa patch clamp-kokeissa kodeiinin todettiin aktivoivan soluja nikotiinireseptorivälitteisesti (Storch ym. 1995). Kodeiinin todettiin olevan galantamiinin kaltainen nAChR:n positiivinen allosteerinen modulaattori (PAM). PC12-soluissa todettiin esiintyvän nikotiinireseptoreja, jotka muodostuvat pääasiassa $\alpha 7$, $\alpha 4$ ja $\beta 2$ nAChR-alayksiköistä. Sen sijaan HN42-soluissa kodeiini ei voimistanut asetyylikoliinin aiheuttamaa vastetta (Sabey ym. 1998). Tulosten poikkeavuus saattaa johtua soluissa esiintyvien nAChR-alatyypin eroista. HN42-solut ovat ihmisen epiteelisolulinja HEK293-soluja, joihin siirretty cDNA-tekniikalla rotan $\alpha 4$ ja $\beta 2$ nAChR-alayksiköitä. PC12-soluissa havaittu kodeiinin aiheuttama vaste saattoi välittyä jonkin muun nAChR-alatyypin kautta. Lisäksi reseptorien rakenteissa saattoi esiintyä eroja. Kodeiinin sitoutumispaikka on kuitenkin pystytty määrittämään *in silico* ihmisen $\alpha 7$ -, $\alpha 3\beta 4$ - ja $\alpha 4\beta 2$ -reseptoreissa. Morfiini on puolestaan osoittautunut ihmisen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR osittaisagonistiksi SH-EP1-h $\alpha 4\beta 2$ -soluissa (Talka ym. julkaisematon havainto 2012). Saadut tulokset ovat alustavia eikä niistä voi vetää suoria johtopäätöksiä ilman *in vivo*-kokeita. Tulosten perusteella voi

kuitenkin esittää hypoteesin, että morfiinin palkitsevat ja kipua lievittävät vaikutukset saattavat välittyä osittain nAChR-aktivaation kautta. nAChR:ja aktivoivia yhdisteitä on lisäksi tutkittu runsaasti Alzheimerin taudin hoidossa (Pandya ja Yakel 2011). Siten morfiinilla ja kodeiinilla saadut tulokset ovat mielenkiintoisia tulevaisuuden lääkekehitystä ajatellen, sillä yhdisteiden molekyyli-runkoa muokkaamalla voidaan potentiaalisesti kehittää uusia, Alzheimerin taudissa käytettäviä lääkkeitä.

4.3.1 Opioidiantagonistien käyttö tupakasta vieroituksessa

Eläinkokeiden ja solupohjaisten töiden tulosten perusteella on perustellusti voitu ajatella opioidiantagonisteilla olevan käyttöä myös ihmisillä tupakasta vieroituksen tukena, sillä opioidiantagonistien vaikutuksesta jyrksijöiden nikotiinin aiheuttamien palkitsevien vaikutusten ilmentyminen vähentyy (Liu ym. 2009). Opioidiantagonistien – etenkin naloksonin ja naltreksonin – käyttöä tupakasta vieroituksesta onkin tutkittu kliinisissä kokeissa. Nämä tutkimukset ovat olleet lähestulkoon ainoita ihmisillä suoritettuja tutkimuksia nikotiinin ja opioidien interaktioista. Tulokset ovat olleet kuitenkin ristiriitaisia.

Satunnaistetuissa lumekontrolloiduissa kaksoissokkotutkimuksissa naloksonin sekä naltreksonin on havaittu toisaalta vähentävän tupakoimista (Karras ja Kane 1980; Covey ym. 1999) ja toisaalta yhdisteillä ei ole havaittu tilastollisesti merkitsevää vaikutusta poltettujen savukkeiden määrään (Sutherland ym. 1995; Wewers ym. 1998). Naltreksonia on tutkittu selvästi naloksonia enemmän johtuen sen naloksonia pidemmästä vaikutusajasta (Berrendero ym. 2010). 100 mg:n naltreksoni-annos on osoittautunut tehokkaaksi lyhytaikaisesti tupakasta vieroituksessa, mutta kuusi kuukautta naltreksoni-hoidon lopettamisen jälkeen tilastollinen merkitsevyys naltreksonia ja lumevalmistetta saaneiden ryhmien välillä tupakoinnin suhteen katosi eikä sillä ollut siten tehoa pysyvässä tupakasta vieroittautumisessa (Covey ym. 1999). Naltreksonilla on saatu kuitenkin lupaavia tuloksia yhteiskäytössä nikotiinikorvaushoidon kanssa (O'Malley ym. 2006). Lisäksi on raportoitu, että naltreksonia saaneet koehenkilöt ovat saaneet savukkeita poltettaessa tupakasta vieroittautumisen kaltaisia oireita (Sutherland ym. 1995). Nikotiiniriippuvuuteen liittyy

erittäin voimakkaasti retkahtaminen riski, jolloin pitkänkin tupakoimattoman ajan jälkeen henkilö aloittaa tupakoimisen uudestaan (Berrendero ym. 2010). 50 mg:n naltreksoni-annoksen vaikutusta retkahduksen estossa on tutkittu, mutta tulokset ovat olleet ristiriitaisia. Vaikka naltreksonin on kliinisissä kokeissa havaittu vähentävän tupakan himoa ilman merkittäviä haittoja, on yhdisteen käyttö osoittautunut myös tehottomaksi (Hutchison ym. 1999; Rohsenow ym. 2007).

Opioidireseptoriantagonistien tehosta tehdyssä Cochrane-katsauksessa on melko yksiselitteisesti todettu, ettei naltreksonin käyttö yksinään tai yhdessä nikotiinikorvaushoidon kanssa ole kannattavaa (David ym. 2006). Vaikka yksittäisistä tutkimuksista on saatu lupaavia tuloksia, joiden perusteella naltreksoni vähentää poltettujen savukkeiden määrää, tutkimuksissa käytettyjen koehenkilöiden määrä on ollut liian pieni varauksettoman totuuden määrittämiseksi. Cochrane-katsaus ei kyennyt määrittelemään myöskään naloksonin mahdollisia hyötyjä tai haittoja tupakoinnin vähentämisessä, lopettamisessa tai tupakasta saatavan nautinnon muuttumisesta.

4.3.2 Opioidikorvaushoitopotilaat ja tupakointi

Opioidiriippuvaisten potilaiden yleinen hoitomuoto on niin kutsuttu korvaushoito, jossa potilaita vieroitetaan etenkin heroiiniriippuvuudesta käyttämällä laskevaa annosta heikkoja opioideja, pääasiassa metadonia ja buprenorfiinia (Käypä Hoito -suositus 2006). Heroiinin käytön on todettu lisäävään poltettujen savukkeiden määrää heroiiniriippuvaisilla (Mello 1980). Lähes jokaisen metadoni- ja buprenorfiinikorvaushoitoa saavan on todettu tupakoivan (Elkader ym. 2009; Pajusco ym. 2012). Metadonikorvaushoidon vaikutusta tupakointiin on tutkittu huomattavasti buprenorfiinia enemmän. Metadonin on todettu lisäävän tupakoinnin aikaansaamaa mielihyvää annosriippuvaisesti (Chait ja Griffiths 1984). Onkin havaittu, että korvaushoitoa saavien henkilöiden käyttämät metadoni-annokset korreloivat suoraan poltettujen savukkeiden määrän kanssa – suuria metadoni-annoksia saavat polttavat pienen metadoni-annoksen saaneita enemmän (Chait ja Griffiths 1984; Frosch ym. 2000). Vastaavasti metadonin itseannostelun on havaittu lisääntyvään selvästi suuria nikotiiniannoksia saaneilla tai vapaasti tupakoineilla koehenkilöillä (Spiga ym. 1998).

Tulosten perusteella nikotiini saattaa voimistaa metadonin palkitsevaa vaikutusta. Toisaalta on osoitettu, että korkeita metadoni-annoksia käyttävien nikotiiniriippuvuus on voimakasta Fagerströmin testillä mitattuna (Clarke ym. 2001). Metadonikorvaushoitopotilaat ovat kertoneet tupakoivansa erityisen paljon metadoniannoksensa saamisen aikoihin kokeakseen suurempaa mielihyvää ja vähemmän metadonin väsyttäviä haittavaikutuksia (McCool ja Paschall Richter 2003). Korvaushoitoa saavat pitävät metadoni-annostaan syynä lisääntyneelle tupakoinnilleen, mutta tupakointi itsessään ei saa heitä käyttämään huumeita (Stein ja Anderson 2003). Tupakoinnin lopettaminen on myös osoittautunut äärimmäisen vaikeaksi metadoni- ja buprenorfiinikorvaushoitoa saavilla potilailla (Wapf ym. 2008). Tupakasta vieroittumisen seurauksena opioidien väärinkäytön on toisaalta osoitettu vähenevän tilastollisesti merkitsevästi (Lemon ym. 2003).

Koska metadonikorvaushoidossa olevilla on havaittu selviä interaktioita tupakan, ja mitä todennäköisimmin sen sisältämän nikotiinin kanssa, on yllättävää, että metadonin reseptoritason vaikutuksia nAChR:hin on tutkittu melko vähän. Suoritettujen tutkimusten tulokset ovat olleet vaihtelevia nAChR-alatyypistä riippuen. Metadonin on todettu estävän rottien $\alpha 3\beta 4$ -nAChR:ien toimintaa KX $\alpha 3\beta 4$ R2-solulinjassa sekä ihmisen $\alpha 4\beta 2$ -reseptorin toimintaa SH-EP1-h $\alpha 4\beta 2$ -solulinjassa (Xiao ym. 2001; Talka ym. julkaisematon havainto 2012). Sen sijaan metadoni on osoittautunut ihmisen $\alpha 7$ -nAChR:n agonistiksi SH-EP1-h $\alpha 7$ -solulinjassa (Pakkanen ym. 2005). Sama vaikutus havaittiin ihmisen neuroblastoomasta eristetyissä SH-SY5Y-soluissa, joissa esiintyy luonnostaan ainakin $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ ja $\beta 4$ -alayksikoista muodostuvia ihmistyyppin nAChR:ja (Peng ym. 1997). Metadonin on kuitenkin osoitettu toimivan SH-SY5Y-solulinjassa $\alpha 3^*$ -nAChR:n antagonistina (Talka ym. julkaisematon havainto 2012). Buprenorfiini on puolestaan osoittautunut rotan $\alpha 3\beta 4$ -nAChR antagonistiksi KX $\alpha 3\beta 4$ R2-soluissa ja ihmisen $\alpha 4\beta 2$ - sekä $\alpha 3^*$ -nAChR:ien antagonistiksi SH-EP1-h $\alpha 4\beta 2$ - ja SH-SY5Y-solulinjassa $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtausmenetelmällä mitattuna (Jozwiak ym. 2006; Talka ym. julkaisematon havainto 2012).

Metadonin agonistinen luonne $\alpha 7$ -nAChR:ssa on korvaushoitopotilaissa tehtyihin havainnot huomioonottaen osin odotetunlainen, sillä kyseistä reseptorialatyyppeä on

todettu esiintyvän erityisen runsaasti muun muassa riippuvuutta säätelevillä aivoalueilla (Gotti ym. 2006). VTA:n $\alpha 7$ -nAChR:t osallistuvat merkittävällä tavalla nikotiinin palkitsevien vaikutusten syntyyn (Woollorton ym. 2003; Gotti ja Clementi 2004). Koska metadonin on havaittu aktivoivan $\alpha 7$ -nAChR:ja *in vitro*, saattaa se selittää tupakan sisältämän nikotiinin voimistunutta, palkitsevaa vaikutusta. Tämä saattaa olla osittain syy siihen, miksi metadonikorvaushoitoa saavat tupakoivat erityisesti metadoniannoksensa jälkeen. Koska $\alpha 7$ -reseptorien luonne riippuvuudessa ja nikotiinin palkitsevien ominaisuuksien syntymisessä poikkeaa esimerkiksi $\alpha 4\beta 2^*$ -reseptoreista (Kuva 8 ja 9), on havainto odotetunkaltainen. $\alpha 4\beta 2$ -reseptorit puolestaan epäherkistyvät nopeasti ja herkästi, etenkin pitkäaikaisen nikotiinialtistuksen seurauksena (Woollorton ym. 2003). Tällöin metadonin estäessä kyseisen nAChR-alatyypin toiminnan tarvitaan nikotiinia enemmän tuottamaan odotetun suuruista mielihyvää, joka voi myös osaltaan selittää korvaushoitoa saavien runsaan tupakoinnin. Koska buprenorfiinin vaikutusta $\alpha 7$ -nAChR:hin ei ole tutkittu, sen vaikutus tupakointiin on epäselvää. Vaikutus saattaa välittyä ainakin osittain metadonin $\alpha 4\beta 2$ -nAChR-antagonismin tavoin.

5 NIKOTIINI JA OPIOIDIT KIVUNLIEVITYKSESSÄ

Ihmisen kokema kipu on merkki kudonsvauriosta tai sen uhasta (Finnerup ym. 2007). Kipua aistivien ääreishermoston hermosolujen vapaat hermopäätteet aktivoituvat haitallisten ärsykkeiden vaikutuksesta. Tällaisia ovat esimerkiksi kudonsvaurion yhteydessä syntyvät prostaglandiinit ja histamiini. Kudonsvaurioalueelta selkäytimen takasarveen kipuaistimuksen vievät myeliinitupettomat C-syyt sekä A δ -syyt, joilla on ohut myeliinituppi (Baron 2009). Näiden viejähaarakkeiden hermosolujen runko-osat sijaitsevat selkäytimen takasarvessa, jossa tapahtuu myös kipuaistimuksen muuntumista välineuronien kautta. Selkäytimen takasarvesta kipuaistimus siirtyy talamuksen kautta aivokuorelle, jossa kiputuntemus aistitaan (Tracey 2005). Puhuttaessa kipuaistimuksesta, johon liittyy fyysisten tekijöiden lisäksi myös emotionaalisia ja kognitiivisia tekijöitä, käytetään subjektiivisesta kokemuksesta termiä kipuelämys.. nAChR:ien rooli kivussa ja nikotiinin vaikutus kipuaistiin on ollut pitkäaikainen tutkimuksen kohde. Tutkimuksissa on saatu selviä viitteitä kolinergisen

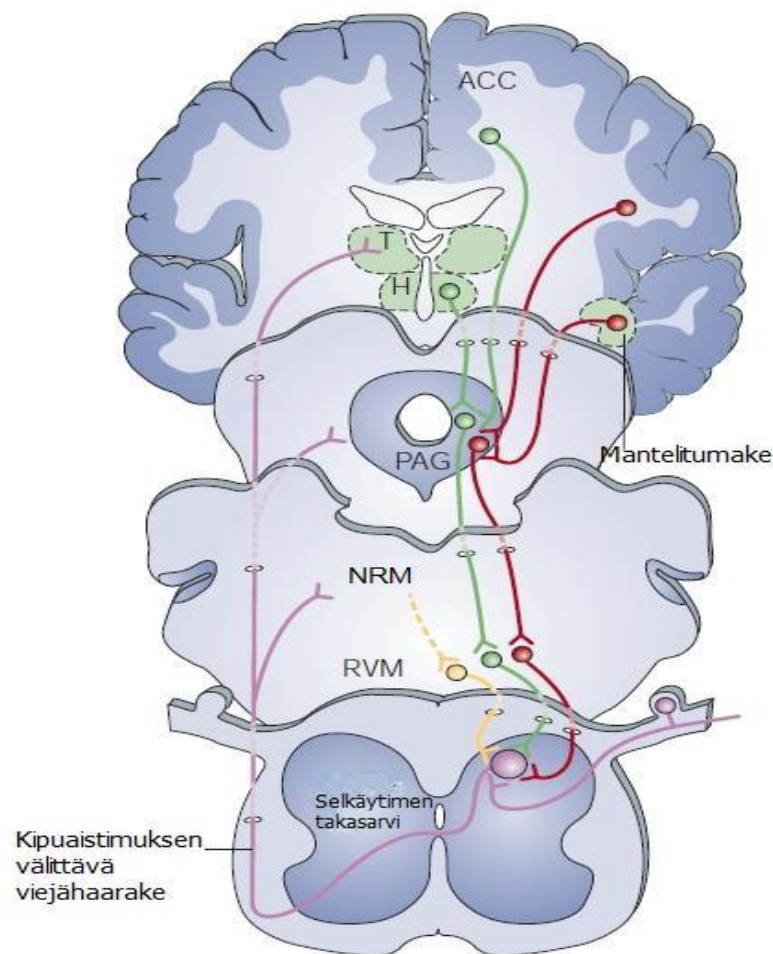
hermojärjestelmän osallisuudesta kipuaistimuksen säätelyssä, josta voimakkaan nAChR-agonisti epibatidiinin analgeettinen vaikutus on hyvä esimerkki (Traynor 1998). Vastaavasti esimerkiksi oopiumunikosta saatavaa morfiinia ja vastaavia opiaatteja on käytetty perinteisesti kivun lievityksessä (Brownstein ym. 1993). Morfiinin kipua lievittävä vaikutus välittyy suoraan endogeenisen opioidijärjestelmän kautta.

5.1 Opioidit kivun lievityksessä

Opioidien kipua lievittävien vaikutusten on katsottu välittyvän selkäytimen takasarven, perifeerisen hermoston ja aivojen opioidireseptorien toiminnan muutosten kautta (Holden ym. 2005). Kudosvaurion seurauksena koettava kipuaistimus välittyy perifeerisestä kudoksesta tiettyjä kipuhermosyitä pitkin selkäytimen takasarveen, josta aistimus välittyy lopulta isoajojen kuorikerrokseen. Selkäytimen takasarven tietyillä alueilla esiintyy runsaasti enkefalinergisiä hermosoluja, jotka toimivat pääasiallisesti paikallisesti vaikuttavina välineuroneina (Basbaum ym. 1986; Pohl ym. 1997; Holden ym. 2005). Selkäytimen takasarvessa on havaittu esiintyvän lisäksi kaikkia kolmea opioidireseptorialatyyppeä (Besse ym. 1990). Reseptorien on havaittu sijaitsevan niin selkäytimen takasarvessa sijaitsevien hermosolujen runko-osissa kuin tuoja- ja viejähaarakkeissa sekä perifeeristen tuovien hermosyiden hermopäätteissä (Holden ym. 2005). Siten on päätelty, että kipuaistimuksen välittyminen selkäytimen takasarveen vapauttaa endogeenisiä opioidipeptideja, ja että opioidireseptorien aktivoituminen niin endo- kuin eksogeenisten yhdisteiden aikaansaamana estää kipuaistimuksen välittymistä aivoihin (Holden ym. 2005). Toisaalta estovaikutuksen tiedetään voivan kohdistua muihin kipuaistimuksen kulkua estäviin järjestelmiin, jolloin opioidireseptoriaktivaatio voi käänteisesti tehostaa kipuaistimuksen välittymistä. Ilmiön uskotaan selittävän, miksi esimerkiksi morfiini saattaa pahentaa erilaisia neuropaattisia kiputiloja.

Aivoissa opioidien kipua lievittävä vaikutus välittyy aivorungossa sijaitsevien, periaqueduktaalisen harmaan alueen (periaqueductal gray, PAG) ja rostraalisen ventromediaalisen ydinjatkeen (rostral ventromedial medulla, RVM) kautta (Holden ym. 2005). PAG:lta saa alkuunsa hermoyhteyksiä RVM:n alueelle, muun muassa raphe magnus -tumakkeeseen (nucleus raphe magnus, NRM) (Stamford 1995; Ossipov ym.

2010). NRM:n hermosoluista puolestaan lähtee viejähaarakkeita kolmoishermon tumakkeeseen sekä selkäytimen takasarveen, jossa ne säätelevät tuovien kipuhermosyiden neurotransmissiota (Fields ym. 1991). Viejähaarakkeet muodostavat selkäytimen takasarvessa synapseja sekä perifeeristen tuovien kipuhermosyiden kanssa että kipuaistimuksen keskushermostoon välittävien tai paikallisesti takasarvessa vaikuttavien välineuronien kanssa (Kuva 10) (Abols ja Basbaum 1981; Glazer ja Basbaum 1981).



Kuva 10. Opioidien keskushermoston kautta välittyvän kivun lievittymiseen osallistuvat hermoradat (mukaillen Fields 2004). Periaqueductaalinen harmaa alue (PAG) säätelee epäsuorasti kipuaistimuksen kulkeutumista keskushermostoon rostraalisen ventromediaalisen alueen (RVM) kautta. Säätelyn seurauksena kipuaistimus voi joko voimistua (punainen) tai lieventyä (vihreä). RVM:n kautta kulkevat, raphe magnus-tumakkeelta (NRM) alkavat serotonergiset hermoradat (keltainen) osallistuvat myös kipuaistimuksen säätelyyn, joka kulkee selkäytimen takasarvesta talamukseen (violetti). Otsalohkon syvästä kuorikerroksesta (anterior cingulate cortex, ACC), hypothalamukselta (H) ja mantelitumakkeelta lähtevät hermoradat osallistuvat PAG:n toiminnan säätelyyn.

RVM:n alueelta lähteviä, laskevia 5-HT-hermoratoja on pidetty keskeisesti osallisina opioidien aikaansaamaan analgesiaan 1980-luvulta lähtien, sillä PAG:n tai RVM:n stimulaation havaittiin lisäävään 5-HT:n vapautumista selkäytimessä ja toisaalta selkäytimen kovakalvonalaisten 5-HT-antagonistin todettiin aiheuttavan kivun lievittymistä *in vivo* jyrksijöillä (Basbaum ja Fields 1978; Yaksh ja Wilson 1979; Cui ym. 1999). 5-HT-radat saavat alkunsa NRM:sta (Kwiat ja Basbaum 1992). Myöhemmin suoritetuissa kokeissa todettiin kuitenkin, että myös muut välittäjäaineet, muun muassa GABA ja glysiini, osallistuvat kipuaistimuksen säätelyyn PAG-RVM-akselin kautta (Potrebic ym. 1994). RVM:n serotonergiset hermosolujen on todettu osallistuvan näiden välittäjäaineiden vapautumisen säätelyyn (Mason 2001). Ainakin selkäytimen takasarven 5-HT₇-reseptorin aktivaation on havaittu saavan aikaan kivun lievittymistä (Brenchart ym. 2009). Kipua lievittävän vaikutuksen mekanismi on kuitenkin osittain epäselvä, sillä kyseisiä reseptoreja sijaitsee sekä tuovissa kipuhermosyissä sekä GABAergisissä välineuroneissa (Pierce ym. 1996; Doly ym. 2005). 5-HT:n lisäksi noradrenaliinin on havaittu osallistuvan kivun lievittymiseen PAG-RVM-akselin aktivaation kautta (Hammond ym. 1985; Cui ym. 1999). Laskevat noradrenergiset hermoradat estävät pre- ja postsynaptisten, adnergisten α_2 -reseptorien kautta kipusignaalin etenemistä selkäytimen takasarvessa (Pertovaara 2006; Ossipov ym. 2010). PAG:lla ja RVM:ssa ei ole noradrenergisia hermosoluja, mutta kyseiset alueet säätelevät muun muassa sinertävän aivotäplän noradrenergisia hermosoluja (Bajic ja Proudfit 1999).

Kivun lievittymiseen osallistuvia, ääreishermostossa sijaitsevia opioidireseptoreja on todettu esiintyvän ohuissa tuovissa kipuhermosyissä, joiden runko-osat sijaitsevat selkäytimen takajuuren hermosolmuissa (Ji ym. 1995). Reseptorien ilmentymisen on havaittu lisääntyvän muun muassa tulehdusreaktion yhteydessä *in vivo* (Stein ym. 2001). Samalla tulehdukseen liittyvän, kudoksessa esiintyvän paikallisen pH-tason nousun on todettu voimistavan opioidireseptoriaktivaatiota *in vitro* (Selley ym. 1993). Tutkimuksissa on saatu myös viitteitä, että leukosyytit tuottavat ja vapauttavat paikallisesti ainakin β -endorfiineja sekä enkefaliineja vasteena tulehdusreaktioon (Ritner ym. 2006; Verma-Ghandu ym. 2006). Näistä havainnoista huolimatta ääreishermostossa sijaitsevien opioidireseptorien merkitys kivun lievityksessä lienee

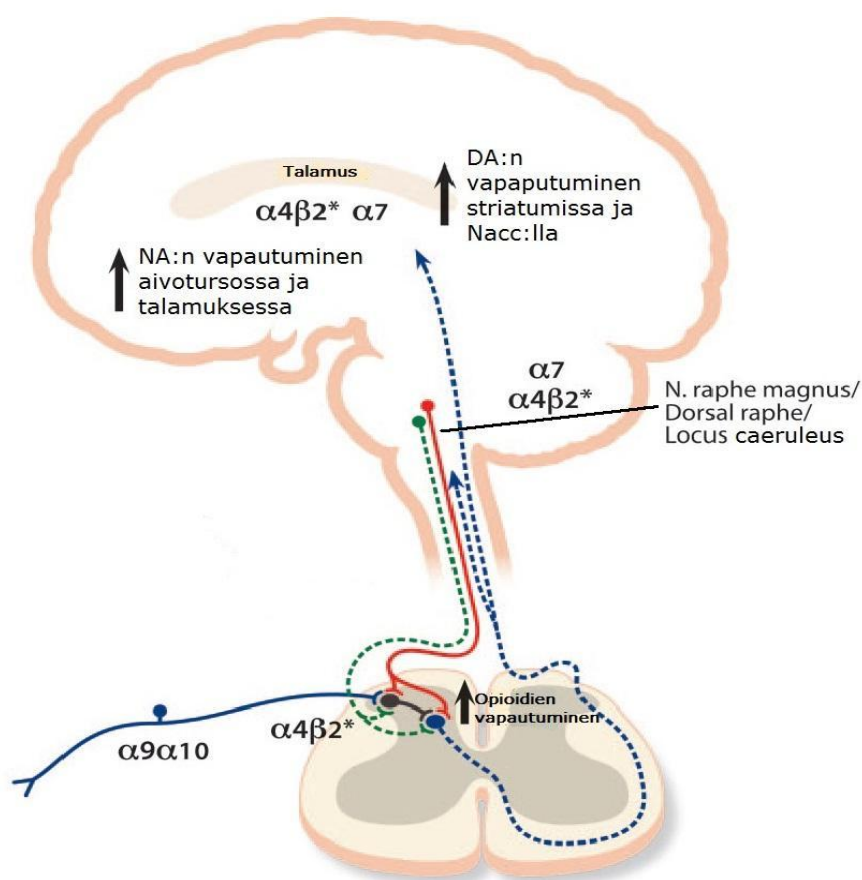
vähäinen tiettyjä kiputiloja lukuun ottamatta (Holden ym. 2005). Perifeeristen opioidireseptorien kautta välittyvää kivun lieventymistä tutkitaan tällä hetkellä kuitenkin runsaasti, sillä paikallisesti vaikuttavilta opioidireseptoriagonisteilta puuttuu keskushermoston kautta välittyviä haittavaikutuksia (Stein ja Lang 2009).

5.2 Nikotiini kivun lievityksessä

nAChR:ien osallisuus kipuaistin säätelyssä on pitkään tunnettu tosiasia (Damaj ym. 1998). Esimerkiksi epibatidiini, äärimmäisen voimakas nAChR-agonisti, on osoittautunut eläinkokeissa jopa 200-kertaa voimakkaammaksi yhdisteeksi kivun hoidossa kuin morfiini (Traynor 1998). Epibatidiinin käyttöä kivun hoidossa rajoittavat kuitenkin sen voimakkaat sivuvaikutukset. Yhdisteen aktiivisuus kuitenkin osoittaa kolinergisen järjestelmän osallistuvan kipuaistimuksen säätelyyn.

Nikotiinin ja sen kaltaisesti käyttäytyvien agonistien kipua lievittävä vaikutus välittyy pääasiallisesti $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR:ien kautta, sillä näiden alayksiköiden suhteen poistogeenisiltä hiiriltä on todettu katoavan nikotiinin kipua lievittävä vaikutus (Damaj ym. 1998; Marubio ym. 1999). Hiirillä nAChR:ien aktivaation on todettu säätelevän laskevien noradrenergisten- ja serotonergisten hermoratojen toimintaa (Iwamoto 1991). $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR:ien uskotaan osallistuvan kivun lievittymiseen aktivoimalla ainakin NRM:stä lähteviä, selkäytimen takasarveen vieviä 5-HT:n laskevia hermoratoja (Kuva 11) (Cucchiaro ym. 2005; Cucchiaro ym. 2006). Locus caeruleuksesta on puolestaan havaittu vapautuvan noradrenaliinia talamukselle ja aivotursoon nAChR-välitteisesti, todennäköisesti $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:n aktivoitumisen seurauksena. Näillä aivoalueilla se vaikuttaa kipua lieventävästi (Kuva 11) (Sacaan ym. 1996). Lisäksi $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR:ien aktivoitumisen on todettu lisäävän noradrenaliinin vapautumista *in vitro* rottien selkäytimestä valmistetuissa synaptosomeissa (Li ja Eisenach 2002). Kyseisten reseptorien on havaittu osallistuvan myös kipuaistimusta estävien GABA- ja glysiini-välineuronien toiminnan säätelyyn (Rashid ym. 2006).

nAChR:t osallistuvat muiden välittäjäainejärjestelmien säätelyyn myös selkäytimen tasolla (Cordero-Erausquin ja Changeux 2001). Kyseisten reseptorien on havaittu säätelevän hiirillä selkäytimen takasarven kipuaistimusta säätelevien GABA- ja glysiinihermosolujen toimintaa estäen siten kipuaistimuksen välittymistä. Selkäytimen takasarvessa kivunlievittymiseen osallistunee ainakin $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ -, $\alpha 7$ -, $\alpha 9$ - ja $\alpha 10$ -alayksiköistä koostuvia nAChR:ja. Esimerkiksi $\alpha 5^*$ -nAChR:ien, kuten $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ - ja $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ -nAChR:ien määrän on havaittu lisääntyvän rottien selkäytimen takasarvessa neuropaattisen kivun eläinmallissa (Vincler ja Eisenach 2004). Reseptorin toiminnan eston on havaittu lievittävän kipua (Ramirez-Latorre ym. 1998).



Kuva 11. nAChR:ien osallisuus kivun lievittymiseen selkäytimen takasarvessa ja aivoissa (mukaillen Shi ym. 2010). Nikotiinin analgeettisen vaikutuksen on todettu välittyvän keskeisimmin $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR:ien aktivoitumisen kautta lisäämällä ja 5-HT:n vapautumista raphe-tumakkeesta selkäytimen takasarveen, sekä lisäämällä NA:n vapautumista locus caeruleuksessa sijaitsevista tumakkeista aivotursossa ja talamuksessa. Lisäksi DA:n vapautumisen on havaittu lisääntyvän Nacc:llä ja aivotursolla ja lievittävän siten kipua. Myös keskushermoston $\alpha 7$ -nAChR:n uskotaan osallistuvan kivun lievittymiseen. Endogeenisiä opioidipeptidejä vapautuu selkäytimen takasarvessa nAChR-välitteisesti. 5-HT = serotoniini, NA = noradrenaliini

$\alpha 7$ -nAChR:ien rooli kivun lievittymisessä on osoittautunut $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR:ien tapaan merkittäväksi tietyissä kiputiloissa (Damaj ym. 2000; Wang ym. 2005; Abdin ym. 2006). Jyrsijöillä suoritetuissa kokeissa $\alpha 7$ -nAChR:ien on havaittu osallistuvan kuitenkin erityyppisen kivun säätelyyn kuin $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChR:t. $\alpha 7$ -nAChR:n agonisti koliini on osoittautunut kipua vähentäväksi yhdisteeksi äkillistä kipua mittaavassa tail-flick-testissä hiirillä sekä selkäyttimeen että suoraan aivoihin annosteltuna (Damaj ym. 2000). Koliinin on todettu toimivan kipua lievittävänä yhdisteenä neuropaattista kipua mittaavissa rottakokeissa sekä tulehduskipua mittaavassa formaliinikokeessa hiirillä (Wang ym. 2005; Abdin ym. 2006). $\alpha 7$ -nAChR:ien vaikutus kivun lievittymisessä välittyyne aistittua kipua välittävien välineuronien eston kautta (Lippiello ym. 2007). On esitetty, että presynaptiset $\alpha 7$ -nAChR:t osallistuvat myös noradrenaliinin ja 5-HT:n vapautumisen säätelyyn selkäytimen takasarvessa (Kuva 11) (Cordero-Erausquin ja Changeux 2001; Rowley ja Flood 2008). $\alpha 7$ -nAChR:ja on havaittu ilmentyvän keskushermoston lisäksi muun muassa makrofageilla, joilla niiden on osoitettu aktivoivan Janus-kinaasi 2:ta (JAK2) (de Jonge ym. 2005). JAK2:n tiedetään osallistuvan tulehdusreaktion ja siihen liittyvän kivun säätelyyn.

Vaikka nAChR:t osallistuvat suoraan erilaisten kipua lieventävien mekanismien säätelyyn, nikotiinin aikaansaaman kivun lieventymisen on havaittu vähenevän μ -reseptoripoistogeenisillä hiirillä (Berrendero ym. 2002). Koska nikotiinin tiedetään vapauttavan endogeenisiä opioidipeptidejä, välittyyne osa nikotiinin kipua lievittävästä vaikutuksesta opioidireseptorien aktivoitumisen seurauksena (Dhatt ym. 1995; Berrendero ym. 2002). Hiirillä suoritettujen tutkimusten perusteella on todettu, että nAChR:ien aktivoituminen selkäytimen takasarvessa vapauttaa paikallisesti ainakin Met-enkefaliinia (Kiguchi ym. 2008) (Kuva 11). PENK-poistogeenisten hiirten kivun lievittymisen on havaittu olevan villityypin hiiriin verrattuna vähäisempää akuutin nikotiiniannoksen seurauksena (Berrendero ym., 2005). Tulokset tukevat käsitystä endogeenisten opioidipeptidien – etenkin enkefaliinin – osuudesta nikotiinin välittämään kivun lievittymiseen. Koska nikotiinin analgeettinen vaikutus ei kuitenkaan häviä täysin näiltä eläimiltä, saattaa se välittyä osittain myös muiden endogeenisten opioidipeptidien kautta. Tulokset eivät myöskään sulje pois selkäytimen takasarven välinneuroneissa ja NRM:llä havaittujen nikotiinireseptorien suoraa osallisuutta kivun

lievittymisessä. Selkäytimen takasarven lisäksi myös Nacc on yhdistetty kipuaistimuksen käsittelyyn ja kivun lievittymiseen (Gear ym. 1999). Nacc:n nAChR:ien toiminnan eston on todettu voimistavan kipuaistimusta rotissa (Schmidt ym. 2001).

Nikotiinin osoittautuessa eläinkokeissa kipua lieventäväksi yhdisteeksi sen tehoa kivun lievittymisessä on tutkittu myös ihmisissä (Flood ja Daniel 2004; Habib ym. 2008; Hong ym. 2008; Turan ym. 2008; Olsson ym. 2009; Jankowski ym. 2011; Yagoubian ym. 2011). Etenkin, kun savukkeita polttavilla on havaittu olevan korkeampi kipukynnys tupakoimattomiin verrattuna, on nikotiinilla uskottu olevan jonkinlaista vaikutusta kipuaistimuksen säätelyssä myös ihmisillä (Girdler ym. 2005). Nenäsumutteena annostellun nikotiinin on havaittu lieventävän kuumuuden aiheuttamaa kipua terveillä vapaaehtoisilla suoritettussa tutkimuksessa (Perkins ym. 1994). Lisäksi nikotiinilaastarin on todettu lieventävän sähköshokkien aiheuttamaa kipua terveillä vapaaehtoisilla tehdyissä kokeissa (Jamner ym. 1998). Näiden tulosten pohjalta nikotiinin tehoa on pyritty määrittämään kontrolloiduissa kliinisissä kokeissa kivunlievitystä tarvitsevilla potilailla.

Nikotiininenäsumutteiden teho on osoittautunut ensimmäisissä kliinisissä satunnaistetuissa, kaksoissokkoutetuissa lumekontrolloiduissa tutkimuksissa varauksellisen lupaavaksi leikkaustenjälkeisen kivun hoidossa tupakoimattomilla koehenkilöillä (Flood ja Daniel 2004; Jankowski ym. 2011; Yagoubian ym. 2011). Tutkittaessa nikotiini- tai lumenäsumutteen tehoa naisten kohdunpoiston jälkeisen kivun hoidossa 3 mg vahvuista nikotiininenäsumutetta saaneet henkilöt kokivat kärsineensä lumeryhmää lievemmästä kivusta tilastollisesti merkitsevästi (Flood ja Daniel 2004). Nikotiinia tai keittosuolaliuosta annosteltiin ennen leikkausta, ja koehenkilöt saivat tarvittaessa myös morfiinia leikkauksenjälkeiseen kipuunsa. Nikotiinia saaneiden havaittiinkin käyttäneen morfiinia lumeryhmää vähemmän. Tutkimukseen osallistui kuitenkin vain 20 vapaaehtoista, joten sen tuloksia ei voi pitää ehdottomina. 3 mg:n vahvuinen nikotiininenäsumute on osoittautunut tehokkaaksi myös pienessä, 20 koehenkilöllä suoritettussa satunnaistetussa, lumekontrolloidussa kaksoissokkotutkimuksessa viisaudenhampaan poistoleikkauksen yhteydessä

(Yagoubian ym. 2011). Nikotiinia saaneet kokivat kärsivänsä keittosuolaliuosta saanutta lumeryhmää lievemmästä kivusta tilastollisesti merkitsevästi siten, että ero oli suurin ensimmäisenä päivänä leikkauksen jälkeen. Ryhmien välillä ei ollut kuitenkaan eroa leikkauksen jälkeisen kipulääkityksen osalta (5 mg/500 mg hydrokodoni/parasetamoli-tabletti). Nikotiininenäsumute (3 mg) on osoittautunut tilastollisesti merkitsevästi keittosuolaliuosta tehokkaammaksi valmisteeksi myös edellä mainittuja kahta tutkimusta suuremmassa, 179 koehenkilöä sisältäneessä satunnaistetussa, kaksoissokkoutetussa lume-kontrolloidussa tutkimuksessa gynekologisen leikkauksen jälkeisen kivun hoidossa (Jankowski ym. 2011). Nenäsumutetta annosteltiin välittömästi leikkauksen jälkeen ennen anestesian lopettamista, ja nikotiinia saanut ryhmä käytti pienemmän annoksen morfiinia lumeryhmään verrattuna leikkauksen jälkeen.

Vaikka nikotiininenäsumute oli kaikissa tutkimuksissa lumelääkettä tehokkaampi, sitä ei käytetty yksinään yhdessäkään tutkimuksessa vaan jokaisessa tapauksessa tutkimusryhmillä oli mahdollisuus käyttää opioidia kivun lievityksessä (Flood ja Daniel 2004; Jankowski ym. 2011; Yagoubian ym. 2011). Koehenkilöiden lukumäärän pienen lukumäärän vuoksi tuloksia ei voi myöskään yleistää suurille potilasryhmille. Nikotiinin verenpainetta kohottava vaikutus tulee myös huomioida potilaita hoidettaessa, vaikka tutkimuksissa ei havaittu nikotiinia saaneiden koehenkilöiden verenpaineessa huomattavaa eroa lumeryhmään verrattuna (Flood ja Daniel 2004; Yagoubian ym. 2011). Tulosten perusteella nikotiininenäsumutteella saattaa olla tulevaisuudessa käyttöä ainakin leikkauksenjälkeisen kivun lievityksessä muiden kipulääkkeiden kanssa käytettynä ja sillä pystyttäneen vähentämään ainakin lievästi opioidien käyttöä tällaisissa tilanteissa.

Nikotiinilaastareiden käytöstä leikkauksenjälkeisessä kivun hoidossa on saatu ristiriitaisia ja heikkoja tuloksia. Ensimmäisissä lumekontrolloiduissa satunnaistetuissa kaksoissokkotutkimuksissa nikotiinilaastari osoittautui jossain määrin lumelaastaria tehokkaammaksi vaihtoehdoksi leikkauksenjälkeisen kivun hoidossa (Habib ym. 2008; Hong ym. 2008). 90 eturauhasen poistoleikkauksen läpikäyneellä, tupakoimattomalla koehenkilöllä suoritettussa kokeessa korvan taakse asetettu 7 mg nikotiinilaastari vähensi leikkauksenjälkeisen opioidien käyttöä, mutta lumeryhmään nähden he eivät

kokeneet kärsivänsä lievempää kipua tilastollisesti merkitsevästi lumeryhmään nähden (Habib ym. 2008). Vastaavasti 40 tupakoimattomalla vatsan alueen leikkauksen läpikäyneellä potilaalla suoritettussa tutkimuksessa 5 – 15 mg nikotiinilaastari lievensi potilaiden kokemaa kipua tilastollisesti merkitsevästi leikkauksen jälkeen, mutta kivun lievityksessä käytettyjen opioidien määrä pysyi nikotiini- ja lumelaastarin saaneiden ryhmien kesken samana (Hong ym. 2008). Tutkimusten tuloksia ei voi pitää aukottomina pienen otoskokonsa vuoksi, mutta ne voi nähdä suuntaa-antavina.

Hongin ja Habibin ryhmien raportointien tulosten jälkeen julkaistut tutkimustulokset nikotiinilaastarin tehosta kivun hoidossa ovat olleet päinvastaisia. 97 naisten vatsan alueen gynekologisen leikkauksen läpikäyneellä potilaalla suoritettuna, lumekontrolloidun satunnaistetun kaksoissokkotutkimuksen tulosten perusteella suuriannoksen 21 mg nikotiinilaastari ei lieventänyt potilaiden kipua lumeryhmään nähden eikä vähentänyt opioidien käyttöä lumelääkkeeseen verrattuna (Turan ym. 2008). 28 tupakoijalla suoritettussa kliinisessä kokeessa havaittiin päinvastaisesti, että 5-15 mg nikotiinilaastarin saaneet koehenkilöt kokivat kärsivänsä kontrolliryhmää voimakkaammasta kivusta heti vatsan tai lantion alueen leikkauksen jälkeen (Olsson 2009). Edellä mainituissa tutkimuksissa nikotiinilaastarin saaneilla koehenkilöillä ei havaittu lumeryhmää merkittävämpää verenpaineen nousua, mutta he kokivat lievästi enemmän pahoinvointia leikkauksen jälkeen kontrolliryhmään verrattuna (Hong ym. 2008; Turan ym. 2008; Olsson ym. 2009). Etenkin pahoinvoinnin kokeminen nikotiiniannoksen yhteydessä siihen tottumattomilla on yleinen haittavaikutus eikä ole siten yllättävää, että nikotiinia saaneet koehenkilöt kärsivät siitä lumeryhmää voimakkaammin.

Ristiriitaiset tulokset nikotiinin kipua lieventävistä vaikutuksista kliinisissä kokeissa voivat selittyä yksinkertaisesti nAChR:ien toiminnan kautta. Suuren agonistiannoksen seurauksena nAChR:t epäherkistyvät, jolloin reseptorien välittämä vaste jää odotettua pienemmäksi. Kliinisissä kokeissa käytetyt nikotiiniannokset ovatkin saattaneet olla liian suuret, jolloin nAChR:ien epäherkistymisen seurauksena reseptorit eivät ole kyenneet välittämään maksimaalista vastettaan, tai liian pienet riittävän reseptoriaktivaation aikaansaamiseksi. Toisaalta kokeissa käytettyjen tutkimusryhmien

koot ovat olleet liian pieniä, jotta tuloksista voisi vetää lopullisia johtopäätöksiä. Myös käytetyllä lääke muodolla näyttää olevan merkitystä nikotiinin kipua lievittävän vaikutuksen välittymisen kannalta: nikotiininenäsumute on osoittautunut lumesumutetta tehokkaammaksi, mutta samoin ei ole käynyt kaikissa tutkimuksissa nikotiinilaastarin kanssa. Nenän kautta annosteltu nikotiiniannos imeytyy systeemiverenkiertoon laastarin annosta nopeammin, joten tällä saatetaan pystyä selittämään osa nenäsumutteen paremmalta vaikuttavasta tehosta. Valmisteita ei voi kuitenkaan verrata keskenään ilman niitä vertailevia kliinisiä kokeita.

Tutkiva lääketeollisuus on myös kääntänyt katseensa niin sanottuihin nikotiinireseptorien positiivisiin allosterisiin modulaattoreihin (PAM), jotka tehostavat endogeenisen asetyylikoliinin tai eksogeenisen nAChR-agonistin vaikutusta kyseisiin reseptoreihin (Lee ym. 2011). PAM:ejä käyttämällä pienemmällä agonistin pitoisuudella aikaansaadaan voimakkaampi nAChR-vaste ilman reseptorin epäherkistymistä. Tällä tavoin vaikuttavista yhdisteistä onkin saatu lupaavia tuloksia (Lee ym. 2011; Zhu ym. 2011).

5.3 Nikotiinin ja opioidien interaktiot kivun hoidossa

Nikotiinin ja opioidien interaktioita kivun lievityksessä on tutkittu ihmisillä vain vähän ja osa julkaistuista tuloksista on esitetty ainoastaan hypoteesin muodossa. Tupakoivien henkilöiden on kuitenkin havaittu vaativan suurempia opioidien annoksia leikkauksen jälkeiseen kipuunsa tupakoimattomiin verrattuna (Creekmore ym. 2004). Tupakojien kipukynnys saattaa olla laskenut sairaalassaoloaikana tupakasta vieroituksen takia (Qiu ym. 2011). Tupakojien ollessa sairaalahoidossa he eivät normaalisti saa tupakoida, joten he eivät saa nikotiinia elimistöönsä sairaalassaoloaikanaan. Tällöin nikotiini ehtii poistua potilaiden elimistöstä, mutta endogeenisen ACh:n pitoisuus ei ole riittävän suuri aikaansaamaan nikotiinista tuttua vastetta (Hukkanen ym. 2005; Taly ym. 2009). Nikotiinikorvaushoidon ei havaittu lieventävän tupakoivien potilaiden kokemaa kipua kontrolliryhmään verrattuna (Turan ym. 2008). Opioidiannosten nostoon liittyy kuitenkin väärinkäytön sekä haittavaikutusten riski, joten tupakojien kivunhoitoon tulee kiinnittää huomioita eri tavalla kuin tupakoimattomien. Esimerkiksi synteettistä

opioidia, tramadolia, on ehdotettu käytettäväksi normaalia suuremmilla annoksilla leikkausten jälkeisessä kivunlievityksessä (Qiu ym. 2011). Tramadoli on osoittautunut kanan $\alpha 7$ -nAChR:n estäjäksi *in vitro* (Shiraishi ym. 2002). $\alpha 7$ -nAChR-antagonismin merkitys kivunlievityksessä on kuitenkin epäselvä.

Opioidien lisääntynyt tarve tupakoijilla saattaa olla seurausta nikotiinin vaikutuksesta opioidireseptoreihin. Pitkäaikaisen nikotiiniannon seurauksena hiirten selkäytimen takasarven μ -opioidireseptorien toiminta voimistuu (Galeote ym. 2006). Ilmiön uskotaan johtuvan elimistön mukautumisesta epäherkistyneiden ja siten toiminnaltaan heikentyneiden nAChR:ien välittämän kivunlievityksen vähentymiseen. Samalla tavalla kuin nAChR:t epäherkistyvät suurilla nikotiiniannoksilla, myös paljon opioideja käyttävillä henkilöillä on havaittu epäherkistymistä ja toleranssin kehittymistä opioidien vaikutuksille (Whistler ym. 1999). Opioideille kehittyvän toleranssin syntymekanismi on osittain epäselvä, mutta μ -reseptorien toiminnan muuttumisesta on ollut viitteitä. Siksi on mahdollista, että tupakoijilla valmiiksi normaalia aktiivisemmin toimivat μ -reseptorit epäherkistyvät tupakoijilla nopeammin, eivätkä opioidirakenteiset kipulääkkeet saa aikaan siten yhtä voimakasta kivun lievittymistä tupakoijilla kuin tupakoimattomilla henkilöillä.

Sen lisäksi, että nikotiinin on havaittu lisäävän tupakoivien potilaiden opioidien käyttöä kivun lievityksessä, on eläinkokeissa saatu viitteitä opioidien välittämästä nikotiinin kipua lieventävän vaikutuksen kumoutumisesta. Pääasiassa yskän hoidossa käytettävän opioidirakenteisen dekstrometorfaanin on todettu estävän nikotiinin kipua lieventävän vaikutuksen hiirillä (Damaj ym. 2005). *In vitro* dekstrometorfaanin on osoitettu estävän $\alpha 4\beta 2^*$ -, $\alpha 3\beta 4$ - ja $\alpha 7$ -nAChR:ja, joten reseptoriantagonismilla saattaa olla kliinistä merkitystä (Hernandez ym. 2000; Damaj ym. 2005). Ilman kunnollisia kliinisiä kokeita ei asiasta voida kuitenkaan olla ehdottoman varmoja. Vastaavanlaisia tutkimuksia ei ole julkaistu muilla opioideilla, joten yleisesti kivun hoidossa käytettyjen opioidien vaikutus nikotiinin analgeettisiin ominaisuuksiin on epäselvä.

Nikotiinin ja opioidien interaktioista julkaistujen vähäisten tutkimustulosten vuoksi ilmiön kliininen merkitys on vielä epäselvä. Koska nikotiinin tiedetään vapauttavan

endogeenisia opioideja ja yhdisteen kipua lieventävä vaikutus perustuu osittain endogeenisen opioidijärjestelmän aktivoitumiseen, interaktioiden tutkimiselle on selkeästi perusteita. Toisaalta tutkimuksia tarvitaan lisää myös opioidien suorista vaikutuksista nAChR:hin. Tulosten perusteella tupakoijien kivunlievitykseen pystyttäisiin suhtautumaan mahdollisesti uudella tavalla. Vastaavasti myös nikotiinin ja nAChR:ien rooli nykyisin käytössä olevien kipulääkkeiden vaikutuksessa saattaa selventyä.

6 YHTEENVETO

Kolinergisen hermojärjestelmän ja endogeenisen opioidijärjestelmän välillä esiintyy kiistatta päällekkäisyyksiä ja interaktioita. Keskeisessä roolissa interaktioiden esiintyvyydessä ovat nAChR:t, jotka osallistuvat useiden eri välittäjäaineiden vapautumisen säätelyyn (Wonnacott 1997; Dani ja Bertrand 2007). Kyseisten reseptorien on havaittu säätelevän myös endogeenisen opioidijärjestelmän toimintaa (Dhatt ym. 1995; Isola ym. 2009). Ilmiöllä saattaa olla keskeinen merkitys nikotiiniriippuvuudessa, vaikka nikotiinin tiedetään aiheuttavan riippuvuutta myös ilman opioidijärjestelmän aktivoitumista (Berrendero ym. 2002). Opioidien palkitsevien vaikutusten on todettu välittyvän pääasiassa μ -reseptorien kautta (Chefer ym. 2003). μ -reseptoripoistogeenisillä hiirillä nikotiinin aiheuttamien palkitsevien vaikutusten on havaittu olevan villityypin hiiriä lievemmat (Berrendero ym. 2002). Tämän vuoksi opioidireseptoriantagonisten, etenkin naltreksonin, käyttöä nikotiiniriippuvuuden hoidossa on tutkittu paljon sekä koe-eläimissä että ihmisissä (Karras ja Kane 1980; Sutherland ym. 1995; Wewers ym. 1998; Covey ym. 1999; De Noble ja Mele 2006; O'Malley ym. 2006; Liu ym. 2009). Opioidiantagonisteilla ei kuitenkaan ole todettu kliinisesti merkittävää tehoa nikotiiniriippuvuuden hoidossa (David ym. 2006). Nämä havainnot ovat osaltaan vahvistaneet käsitystä, että nikotiiniriippuvuus välittyy myös muiden välittäjäainejärjestelmien kuin endogeenisen opioidijärjestelmän kautta. Erityisesti GABA-hermosolujen osallisuus nikotiiniriippuvuudessa on osoittautunut merkittäväksi (Manswelder ym. 2002; Gotti ja Clementi 2004). Toisaalta nikotiiniriippuvuudessa endogeenisen opioidijärjestelmän roolin on havaittu

voimistuvan pitkällä aikavälillä eläinkokeissa (Berrendero ym. 2002; Trigo ym. 2009). Nykyisen tutkimustiedon pohjalta kiistattomien johtopäätösten vetäminen on vielä mahdotonta, joten endogeenisen opioidijärjestelmän sekä GABA-hermosolujen roolia nikotiiniriippuvuudessa tulee tutkia enemmän.

Opioidiriippuvaisten, korvaushoitoa saavien potilaiden on havaittu tupakoivan äärimmäisen runsaasti muuhun väestöön nähden (Elkader ym. 2009; Pajusco ym. 2012). Potilaiden on todettu tupakoivan huomattavan paljon välittömästi metadoniannoksensa jälkeen kokeakseen suurempaa mielihyvää (McCool ja Paschall Richter 2003). Tupakoinnin lopettaminen on myös osoittautunut korvaushoitopotilaille muuta väestöä haastavammaksi (Wapf ym. 2008). Toisaalta opioidien väärinkäytön on havaittu vähenevän tupakasta vieroittautumisen seurauksena (Lemon ym. 2003). Metadonilla ja niin ikään opioidiriippuvaisten hoidossa käytettävällä buprenorfiinilla tiedetään esiintyvän suoria, reseptoritasen interaktioita $\alpha 4\beta 2$ - ja $\alpha 7$ -nAChR:lla (Xiao ym. 2001; Pakkanen ym. 2005; Talka ym. julkaisematon havainto 2012). Ilmiö saattaa selittää osaltaan havainnon korvaushoitopotilaiden lisääntyneestä tupakoinnista, mutta tarkan mekanismin selvittämiseksi asiasta tulee tehdä lisäkokeita.

nAChR:ien aktivoitumisen on havaittu osallistuvan kivunlievitykseen sekä aivorungon alueen tumakkeissa että selkäytimen takasarvessa (Damaj ym. 1998; Cordero-Erausquin ja Changeux 2001). Endogeeninen opioidijärjestelmä vaikuttaa kivunlievityksessä samoissa keskushermoston osissa (Holden ym. 2005). nAChR-aktivaation aikaansaama kivunlievitys välittyy ainakin osittain endogeenisten opioidipeptidien vapautumisen kautta, mutta nAChR:ien rooli kivunlievityksessä on kiistaton (Kiguchi ym. 2008). Tupakojien kivunlievitys leikkauksenjälkeisessä kivussa on osoittautunut haastavaksi ja heille joudutaan käyttämään usein muuta väestöä suurempia määriä opioidijärjestelmän kautta vaikuttavia kipulääkkeitä (Creekmore ym. 2004; Qiu ym. 2011). Ilmiön taustojen uskotaan olevan selvillä osittain, mutta tupakojien onnistuneen kivunlievityksen saavuttamiseksi tulee myös tällä osa-alueella tehdä lisätutkimuksia.

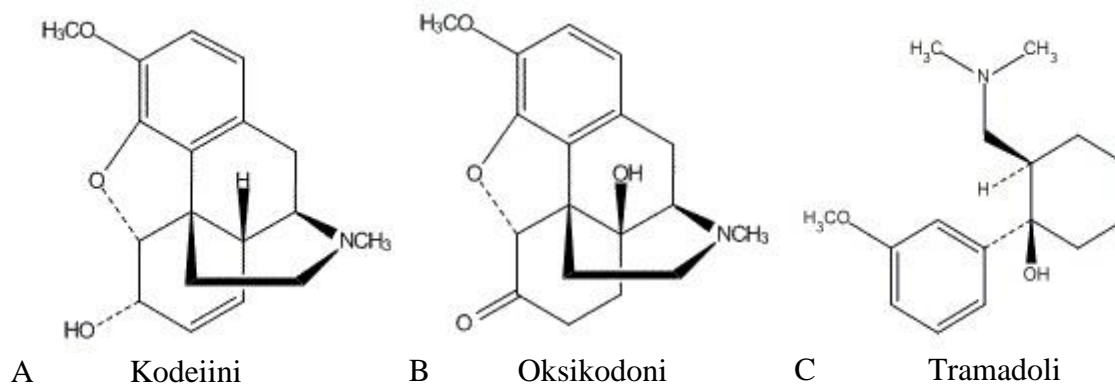
KOKEELLINEN OSA:

1 JOHDANTO

Edeltävässä kirjallisessa osassa on käsitelty nikotiinin ja opioidien interaktioita *in vivo* ja *in vitro*. On selvää, että interaktioita esiintyy niin riippuvuudessa (Tanda ja Di Chiara 1998; Berrendero ym. 2002; Liu ym. 2009b; Trigo ym. 2009) kuin kivun hoidossa (Schmidt ym. 2001; Berrendero ym. 2002; Berrendero ym. 2005; Kiguchi ym. 2008). Interaktioiden solutason tausta on kuitenkin yhä monella tapaa epäselvä. Lisäksi useissa tutkimuksissa on keskitytty nikotiinin ja eri nAChR-alatyyppeiden endogeeniseen opioidijärjestelmään kohdistuviin vaikutuksiin. Vastaavasti on havaittu, että myös endogeenisen opioidijärjestelmän kautta vaikuttavilla eksogeenisillä yhdisteillä esiintyy suoria yhteisvaikutuksia nAChR:ien kanssa (Almeida ym. 2000; Xiao ym. 2001; Damaj ym. 2005; Pakkanen ym. 2005; Talka ym. julkaisematon havainto 2012). Opioidien vaikutukset nAChR:hin saattavat selittää nikotiinin ja opioidien yhteiskäytössä havaittuja ilmiöitä, kuten metadonin ja tupakoinnin välistä yhteyttä (Chait ja Griffiths 1984; McCool ja Paschall Richter 2003; Elkader ym. 2009) tai tupakoivien henkilöiden kivun hoitoon liittyviä seikkoja (Qiu ym. 2011).

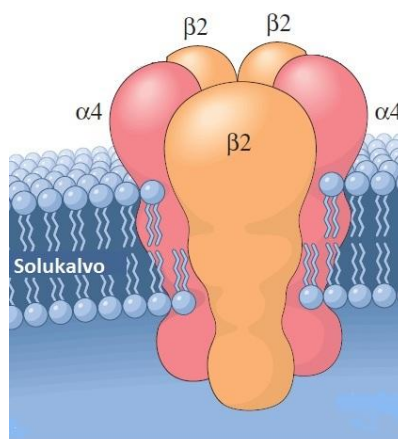
Erikoistyon tarkoituksena oli tutkia kodeiinin, oksikodonin ja tramadolin sitoutumista ja toiminnallista vaikutusta ihmisen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:hin. Kyseisiä opioideja käytetään voimakkaan kivun hoidossa. Kodeiini (Kuva 12 A) on morfiinin aihiolääke: normaalisti noin 10 % kodeiiniannoksesta metaboloituu μ -reseptoriagonisti morfiiniksi (Thorn ym. 2009). Myös kodeiini sitoutuu μ -reseptoriin, mutta huomattavasti morfiinia heikommin (Peckham ja Traynor 2006). Oksikodoni (Kuva 12 B) aktivoi morfiinin tavoin μ -reseptoreja, mutta sen on havaittu olevan morfiinia tehokkaampi kivun lievityksessä. Tramadoli (Kuva 12 C) aktivoi heikosti μ -reseptoreja, mutta yhdisteen kipua lievittävä vaikutus välittyy osittain myös noradrenaliinin ja 5-HT:n takaisinoton eston kautta (Raffa ym. 1991). Oksikodonin ja nikotiinin välisiä interaktioita ei ole tutkittu aiemmin *in vitro* tai eläinkokeissa. Kodeiinin on puolestaan havaittu voimistavan asetyylikoliinin vastetta PC12-solulinjassa, joka ilmentää ainakin rottien $\alpha 7$, $\alpha 4$ ja $\beta 2$ -nAChR-

alayksikköjä (Storch ym. 1995). Tramadolín on puolestaan todettu toimivan $\alpha 7$ -nAChR:n estäjänä *in vitro* (Shiraishi ym. 2002)



Kuva 12. Erikoistyyssä käytettyjen opioidien rakennekaavat (Merck Index 2006).

$\alpha 4\beta 2$ -nAChR on yksi keskushermoston yleisimmistä nAChR-alatyypeistä (Kuva 13) (Wu & Lukas, 2011), jota esiintyy lähes kaikilla aivoalueilla sekä selkäytimen takasarvessa (Li ja Eisenach 2002; Gotti ym 2006). $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ia on lisäksi todettu esiintyvän kahdessa rakenteeltaan erilaisessa muodossa: matalan affiniteetin $\alpha 3\beta 2$ - sekä korkean affiniteetin $\alpha 2\beta 2_3$ -nAChR:na (Marks ym. 1999; Marks ym. 2000; Picciotto ym. 2001). Erikoistyyssä tutkitaan kyseisen nikotiinireseptorin toimintaa opioidialtistuksen seurauksena SH-EP1-h $\alpha 4\beta 2$ soluissa. Solulinja ilmentää spesifisti ihmisen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ia (Eaton ym. 2003). $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:eilla tehtyjä vastaavanlaisia tutkimuksia on julkaistu hyvin vähän, vaikka kyseessä on keskushermoston yleisimpiä nAChR-alatyyppejä. Monet tutkimuksista on lisäksi tehty solulinjoilla, jotka eivät ilmennä ihmisen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ia, vaan esimerkiksi rotan vastaavaa reseptorialatyyppiä (Sabey ym. 1998; Hernandez ym. 2000; Damaj ym. 2005).



Kuva 13. $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:n rakenne (mukaillen Mroziwicz ja Tyndale 2010). Reseptori koostuu viidestä solukalvon läpäisevästä alayksiköstä. Niiden väliin jää veden täyttämä ontto kanava, jonka kautta positiivisesti varautuneet ionit siirtyvät ionikanavan avauduttua solun sisään. $\alpha 4\beta 2$ -nAChR voi muodostua myös kolmesta $\alpha 4$ - ja kahdesta $\beta 2$ -alayksiköstä.

Kodeiinin, oksikodonin ja tramadolin sekä $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:n interaktioiden tutkimisessa hyödynnettiin äärimmäisen voimakkaasti $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:iin sitoutuvaa, radioleimattua nuolimyrkkysammakosta eristettyä [^3H]-epibatidiinia. Tutkimalla syrjäyttävätkö opioidit [^3H]-epibatidiinin $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:sta pyrittiin selvittämään sitoutuvatko kodeiini, oksikodoni tai tramadoli $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ihin. Yhdisteiden vaikutusta $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ien toimintaan tutkittiin puolestaan hyödyntämällä radioaktiivista $^{86}\text{Rb}^+$ -ionia, joka käyttäytyy solulinjalla K^+ -ionin tavoin (Lukas ym. 2002). SH-EP1-hä4 $\beta 2$ -solujen solukalvon Na^+ - K^+ -ATP-siirtäjäproteiinit kuljettavat $^{86}\text{Rb}^+$ -ionit K^+ -ionin tavoin solun sisään. $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ien aktivoituessa $^{86}\text{Rb}^+$ -kulkeutuu avoimista ionikanavista solusta ulos. Radioaktiivisen ionin vapautuminen havainnoitiin nAChR-aktivaation osoittamiseksi.

Nikotiinin ja opioidien interaktioita on tutkittu aiemmin SH-EP1-hä4 $\beta 2$ -soluilla morfiinilla, metadonilla, buprenorfiinilla, naloksonilla ja naltreksonilla (Talka ym. julkaisematon havainto 2012). Ainoastaan morfiinin havaittiin kilpailevan [^3H]-epibatidiinin kanssa samasta sitoutumiskohdasta $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:lla ja $^{86}\text{Rb}^+$ -kokeessa yhdiste osoittautui kyseisen nikotiinireseptorin osittaisagonistiksi. Muut tutkituista opioideista toimivat nikotiinireseptorin ei-kilpailevina antagonisteina. Erikoistystä

saadut tulokset täydentävät aiempaa tutkimusta tuoden lisätietoa yleisesti kivun hoidossa käytettyjen opioidien mahdollisista interaktioista ihmisen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ien kanssa.

2 MATERIAALIT

2.1 SH-EP1- $\alpha 4\beta 2$ solulinja

SH-EP1 solut ovat ihmisen neuroblastoomasolulinja SK-N-SH:sta eristettyjä epiteelisoluja, joilla on siten neuronien kaltaisia ominaisuuksia (Biedler ym. 1978). SH-EP1-solut eivät ilmennä luonnostaan mitään nAChR-alatyyppeä, mutta niissä on μ - ja δ -opioidireseptoreja (Baumhaker ym. 1993; Lukas ym. 1993). SH-EP1- $\alpha 4\beta 2$ solut ilmentävät kuitenkin spesifisti ainoastaan humaani- $\alpha 4\beta 2$ -reseptoreja, jotka on siirretty solulinjaan komplementaari-DNA-tekniikalla (Pacheco ym. 2001; Eaton ym. 2003). Siten solulinja soveltuu erinomaisesti juuri $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ien ominaisuuksien tutkimukseen. Solulinja on saatu tohtori Ronald J. Lukasilta Barow'n Neurologisesta Instituutista (St. Joseph's Hospital and Medical Centre, Phoenix, Arizona).

2.2 Reagenssit

| | |
|--|-----------------------------------|
| Albumiini (naudan seerumi) fraktio V (BSA) | Sigma-Aldrich, Steinheim, Saksa |
| Albumiinistandardi 2 mg/ml (naudan seerumi) | Thermo Scientific, Rockford, USA |
| Amfoterisiini B 250 μ g/ml | Gibco-Invitrogen, Paisley, UK |
| Bradford-värireagenssi | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Dimetyylisulfoksidi (DMSO) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

| | |
|--|--|
| Etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS) | Biotekniikan instituutti, elatuslaboratorio, Helsinki, Suomi |
| Glukoosi | Sigma-Aldrich, Steinheim, Saksa |
| HEPES ($C_{16}H_{35}N_4O_4SNa$) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| [3H]-epibatidiini (55,8 Ci/mmol) | Perkin Elmer, Boston, MA, USA |
| Hevosen seerumi (Horse's serum) | Thermo Scientific, Utah, USA |
| Hygromycin B 20 mg/ml | Invitrogen, Kiina |
| Kaliumfosfaattitrihydraatti | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Kaliumfosfaatti | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Kaliumkloridi | Merck KGaA, Darmstadt, Saksa |
| Kalsiumkloridi | Merck Eurolab Oy, Espoo, Suomi |
| Karbamyylikoliinikloridi | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Kodeiini | Yliopiston Apteekki, Helsinki, Suomi |
| Mekamyyliamiinihydrokloridi | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Natriumhydroksidi | VWR International Ltd, Poole, UK |
| Natriumkloridi | Merck KGaA, Darmstadt, Saksa |
| Naudan seerumi (FBS) lämpöinaktivoitu | Thermo Scientific, Utah, USA |
| (-)-Nikotiinivetytartraatti | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

| | |
|---|--|
| Oksikodonihydrokloridi | Yliopiston Apteekki, Helsinki, Suomi |
| OptiPhase HiSafe3-tuikeneste | Wallac Oy, Milton, UK |
| Penisilliini-streptomysiiniliuos 10 000 U/ml, 10 000 µg/ml | Gipco-Invitrogen, Paisley, UK |
| Polyetyleeni-imiini (PEI) 50 %(W/V) | Sigma-Aldrich, Steinheim, Saksa |
| ⁸⁶ Rubidium ⁺ (2 mCi) | PerkinElmer, Boston, MA, USA |
| Natriumlauryylisulfaatti (SDS) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Sytisiini | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Tramadolihydrokloridi | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Trypsiini-EDTA | Biotekniikaninstituutti, elatuslaboratorio, Helsinki, Suomi |
| Zeocin TM 100 mg/ml | InvivoGen, San Diego, CA, USA |
| 2.3 Laitteet | |
| Bio-Rad 680 absorbanssilukija | Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca, USA |
| Falcon MultiWell 24-kuoppalevy | Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA |
| MultiScreen®HTS 96-lasikuitusuodatinkuoppalevy | Millipore Corporation, Billerica, MA, USA |
| Rinco Ultrasonics bio 70 sonikaattori | Ringo Ultrasonics, Suomi |

Sorvall RC5B plus sentrifuugi

Kendro Laboratory, Newtown, USA

Trilux 1450 Wallac Microbeta
nestetuikelaskin

Wallac Oy, Turku, Suomi

3 MENETELMÄT

3.1 Solujen viljely

SH-EP1-hα4β2-soluja kasvatettiin jatkuvasti inkubaattorissa vakaisissa oloissa (+37 °C, 5 % CO₂) 75 cm² viljelypulloissa (Nunc A/S, Roskilde, Tanska). Solut jaettiin kahdesti viikossa, ja kokeissa käytettiin soluja jakoluvuilla P11-20. Solujen kasvatukseen käytettiin elatusliuosta, joka koostui DMEM-liuoksesta (Dulbecco's modified Eagle medium, lisätty korkea pitoisuus glukosia, L-glutamiinia ja natriumpuryvaattia), naudan sikiön seerumista (Fetal bovine serum), hevosen seerumista (Horse serum) sekä antibiooteista (penisilliini, streptomysiini, hygromysiini, amfoterisiini B ja zeocin). Soluja jaettaessa ne irrotettiin kasvatuspullon pohjasta trypsiini-EDTA-liuoksen avulla.

3.2 Kudoshomogenaatin valmistaminen

Sitoutumiskokeita varten SH-EP1-hα4β2-soluista valmistettiin solukalvohomogenaatteja. Homogenaattien valmistusta varten SH-EP1-hα4β2-soluja jaettiin kasvamaan 175 cm² viljelypulloihin. Solujen kasvettua pullon pohja täyteen, pullosta kaadettiin elatusliuos pois, soluja pestiin kylmällä PBS:llä (Phosphate buffer saline; 150 mM NaCl, 8 mM K₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) kolme kertaa ja solut irrotettiin mekaanisesti kylmään fosfaattipuskuriliuokseen. Irrotetut solut siirrettiin Sorvall-fuugausputkiin, jossa ne homogenisoitiin ultraäänisonikaattorilla (2 x 15 sekuntia). Homogenaatteja fuugattiin 13 000 rpm 4 °C 20 minuutin ajan. Fuugauksen jälkeen supernatantti kaadettiin pois, pelletti liuotettiin 800 µl:aan kylmää fosfaattipuskuria ja siirrettiin 1,5 ml:n Eppendorf-putkiin. Homogenaatit säilöttiin pakastamalla Eppendorf-putket -80 °C.

3.3 Saturaatiositoutuminen

Nikotiinireseptorien ligandinsitominaisuuksia määritettiin saturaatiositoutumiskokeessa. SH-EP1- $\alpha 4\beta 2$ soluista valmistetut jäädytetyt kudoshomogenaatit sulatettiin ja rehomogenisoitiin jäiden päällä ultraäänisonikaattorilla 2 x 5 sekuntia. Homogenaattien proteiinipitoisuus määritettiin Bradfordin menetelmällä. Proteiinipitoisuuden määrittäminen perustuu Coomassie Brilliant Blue G-250 väriaineen sitoutumiseen näytteessä olevaan proteiiniin, jolloin sen väri muuttuu punertavan ruskeasta siniseksi (Bradford 1976). Värimuutoksen voimakkuus on riippuvainen näytteen proteiinipitoisuudesta, ja se määritetään havainnoimalla liuoksen absorbanssia 595 nm aallonpituudella. Absorbanssi kasvaa lineaarisesti näytteen proteiinipitoisuuden suhteen.

Sitoutumiskokeet suoritettiin Multiscreen HTS 96-kuoppalevyillä, jonka kuoppiin lisättiin 250 μ l 0,1 % PEI-liuosta, joka vähentää tuikelaskennan epäspesifiä taustasäteilyä. Kudoshomogenaattia laimennettiin kaliumfosfaattipuskurilla ja 1 % BSA-liuoksella niin, että jokaiseen kaivoon tuli 0,033 μ g/ μ l proteiinia. Proteiinista käytettiin näin matalaa pitoisuutta johtuen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ien korkean epibatidiiniaffiniteetin aiheuttamasta ligandidepleetiosta. Totaalisitoutuminen määritettiin 96-kuoppalevyillä lisäämällä proteiininäytteen joukkoon ainoastaan [3 H]-epibatidiinia ja 50 mM kaliumfosfaattipuskuria (pH 7,4) (50 μ l/kaivo). [3 H]-epibatidiinin epäspesifi sitoutuminen määritettiin estämällä sen sitoutuminen reseptoreihin 1 mM nikotiinivetytartraatti-liuoksella. Totaalisitoutumisesta vähennettiin epäspesifin sitoutumisen arvot [3 H]-epibatidiinin spesifisitoutumisen määrittämiseksi. Saturaatiositoutumisen määrittämisessä [3 H]-epibatidiinista käytettiin kahdeksaa laimennosta (50 – 5000 pM), joita pipetoitiin kolmesta neljään rinnakkaiseen kuoppaan 96-kuoppalevyllä. Levyjä inkuboitiin kaksi tuntia huoneenlämmössä, jonka jälkeen ne pestiin PBS:llä ja kuivattiin. Kuivuneisiin kaivoihin lisättiin 30 μ l Hi-Safe-tuikenestettä, jonka jälkeen kuoppien säteily mitattiin Wallac 1450 MicroBeta-tuikelaskurilla. Saaduista arvoista määritetään K_d -arvo, joka kuvaa ligandin kykyä sitoutua tutkittavien solujen ilmentämiin nAChR:hin, ja B_{max} -arvo, joka osoittaa näytteessä olevien

sitoutumispaikkojen kokonaismäärän, eli kuinka suuri pitoisuus tarvitaan tutkittavaa yhdistettä täyttämään kaikki näytteessä olevat spesifit sitoutumispaikat.

3.4 Kilpaileva sitoutuminen

Opioidien kykyä syrjäyttää $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:iin sitoutunut [^3H]-epibatidiini tutkittiin kilpailevalla sitoutumiskokeella. Tutkittavina yhdisteinä käytettiin nikotiinia, $\alpha 4\beta 2$ -osittaisagonisti sytisiiniä, kodeiinia, tramadolia ja oksikodonia. Koe suoritetaan samalla tavalla kuin saturaatiositoutumiskoe sillä erotuksella, että [^3H]-epibatidiinista käytettiin 150 pM pitoisuutta ja tutkittavia yhdisteitä pitoisuuksilla 0,0001 – 300 μM (nikotiini ja sytisiini) tai 0,001 – 3 000 μM (kodeiini, oksikodoni ja tramadoli).

3.5 $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtauskoe

Tutkittavien yhdisteiden mahdollista $\alpha 4\beta 2$ -reseptoriagonismia ja -antagonismia tutkittiin $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtauskokeella. Tutkittavilla opioideilla, nikotiinilla ja karbamyylikoliinilla suoritettiin $^{86}\text{Rb}^+$ -stimulaatio, jolla määritettiin vertailuyhdisteiden kyky aktivoida $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ja. Yhdisteiden mahdollista antagonismia, ominaisuuksia kilpailla nikotiinin kanssa samasta sitoutumispaikasta ja muita $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:n toiminnallisia muutoksia tutkittiin puolestaan $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtausta hyödyntäen käyttämällä kokeissa eri nikotiinipitoisuuksia ja vakaata tutkittavan yhdisteen (opioidit ja mekamyyliamiini, ei-kilpaileva nAChR-antagonisti) pitoisuutta, sekä vastaavasti vakaata nikotiinipitoisuutta ja useaa pitoisuutta tutkittavaa yhdistettä.

Kokeet suoritettiin keskenään samalla tavalla. Solut jaettiin kasvamaan koetta edeltävänä päivänä 500 μl :n tilavuudessa 24-kuoppalevylle ja niiden annettiin kiinnittyä 4 – 6 tuntia. Tämän jälkeen kuopista imettiin medium pois ja tilalle laitettiin 250 μl $^{86}\text{Rb}^+$ sisältävää mediumia. $^{86}\text{Rb}^+$:n annettiin siirtyä Na-K-ATPaasin avulla SH-EP1- $\alpha 4\beta 2$ -solujen sisään yön yli. Koepäivänä $^{86}\text{Rb}^+$ -medium imettiin kuopista pois ja solut pestiin flip plate-menetelmällä: toisen 24-kuoppalevyn kuopat täytettiin ulosvirtauspuskuriliuksella, huuhtelu- ja solulevy asetettiin vastakkain ja käännettiin ylösalaisin, jolloin huuhtelulevyn ulosvirtauspuskuriliuos joutui solulevylle. Nesteen

annettiin seistä solulevyllä minuutin ajan, jonka jälkeen levyt käännettiin takaisin jolloin huuhtelunesteenä käytetty ulosvirtauspuskuriliuos siirtyi takaisin huuhtelukuoppalevyyn. Tällä tavoin solujen ulkoinen $^{86}\text{Rb}^+$ saatiin huuhdottua pois.

Solulevy imettiin mahdollisimman kuivaksi ennen testiliuosten lisäämistä, jotta liuokset eivät laimenisi. Testattavia aineita sisältävät liuokset lisättiin solulevyille huuhtelunesteen tavoin, asettamalla tutkittavia yhdisteitä sisältävä 24-kuoppalevy solulevyn päälle ja kääntämällä ylösalaisin viideksi minuutiksi. Tänä aikana tutkittavat yhdisteet ehtivät aktivoida $\alpha 4\beta 2$ -reseptoreja riittävästi, jotta solunsisäinen $^{86}\text{Rb}^+$ pääsi virtaamaan soluista ulos tutkittavia yhdisteitä sisältävään liukseen. Viiden minuutin kuluttua levyt käännettiin takaisin, testiliuoksia sisältäneisiin kuoppiin asetettiin valkoinen X-talk-reunus ja soluista vapautuneen $^{86}\text{Rb}^+$:n aikaansaama gammasäteily mitattiin Wallac MicroBeta-tuikenestelaskurilla.

3.6 Datan analysointi

Kokeista saadut tulokset analysoitiin GraphPad Prism-tietokoneohjelmalla (versio 5.2; GraphPad Software, Inc.). Saturaatiositoutumiskokeiden tuloksista määritettiin sitoutumisvakio (K_D) ja sitoutumispaikkojen kokonaismäärä (B_{\max}) ei-lineaarisella yhden sitoutumispaikan mallilla. Kilpailevan sitoutumisen tuloksista laskettiin annos-vaste-kuvaajat niin ikään ei-lineaarisella yhden sitoutumispaikan mallilla. Saadut lukuarvot sijoitettiin kuvaajaan hyödyntämällä sitoutumisen tasapainovakiota (K_i), joka saatiin laskettua kaavasta 1.

$$Y = \text{Pohja-arvo} + \frac{(\text{Huippuarvo} - \text{Pohja-arvo})}{(1 + 10^{(X - \log EC50)})}, \text{ jossa}$$

$$\log EC50 = \log(10^{\log K_i} \times (1 + \frac{\text{Radioligandi}}{\text{HotK}_d}))$$

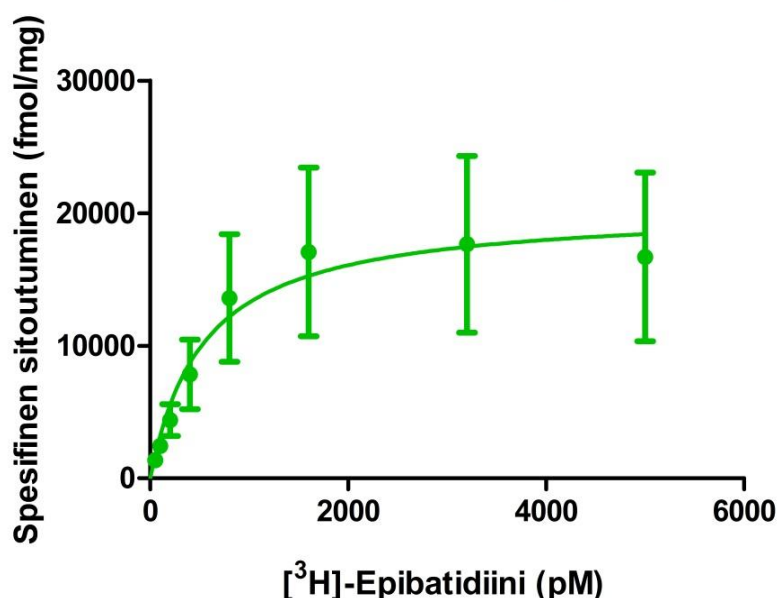
Kaava 1. Laskukaava sitoutumisen tasapainovakiolle (K_i), jonka avulla kilpailevan sitoutumisen tulosten lukuarvot sijoitettiin annos-vaste-kuvaajaan. $\text{HotK}_d = [^3\text{H}]\text{-epibatidiinin sitoutumisen tasapainovakio}$; huippu- ja pohja-arvo = annos-vaste-kuvaajan korkein ja matalin arvo Y-akselilla; $\log K_i$ = tutkitun yhdisteen molaarisen sitoutumisen tasapainovakion logaritminen arvo; radioligandi = $[^3\text{H}]\text{-epibatidiinin pitoisuus}$.

$^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtauskokeiden tuloksista määritettiin spesifisinen $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtaus, jotka saatiin vähentämällä $^{86}\text{Rb}^+$ -totaaliulosvirtauksen arvoista epäspesifinen $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtauksen lukuarvot. Spesifit $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtauksen arvot sovitettiin yksivaiheiseen Hillin yhtälöön, jonka tuloksista määritettiin EC_{50} - ja IC_{50} -lukuarvot. Tulosten tilastollista merkitsevyyttä ei määritetty pienen toistomäärän vuoksi: jokaisessa koeasetelmassa suoritettiin kaksi tai kolme rinnakkaista koetta kolmesti toistaen.

4 TULOKSET

4.1 $[^3\text{H}]$ -epibatidiinin saturaatiositoutuminen SH-EP1- $\alpha 4\beta 2$ solukalvohomogenaatissa

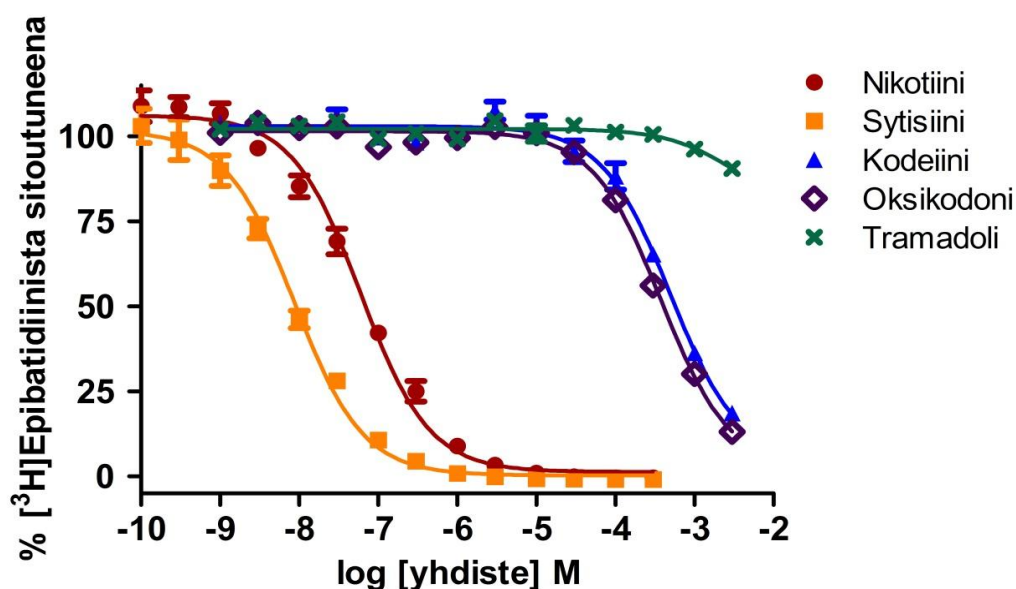
Saturaatiositoutumisen tulokset on esitetty kuvassa 14. $[^3\text{H}]$ -epibatidiini sitoutui saturoituvasti $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:iin pitoisuusalueella 0 – 5 000 pM. Tuloksista laskettu B_{max} arvo on $20\,409 \pm 2\,168$ fmol/mg proteiinia ja K_d arvo $540,2 \pm 194,8$ pM.



Kuva 14. $[^3\text{H}]$ -epibatidiinin sitoutuminen $\alpha 4\beta 2$ nAChR:iin pitoisuusalueella 0 – 5 000 pM (keskiarvo \pm SEM, $n = 3$). Sitoutuminen on saturoituvaa. Tuloksista laskettu B_{max} arvo on $20\,409 \pm 2\,168$ fmol/mg proteiinia ja K_d arvo $540,2 \pm 194,8$ pM.

4.2 Kilpaileva sitoutuminen SH-EP1-h α 4 β 2 soluissa

Nikotiinin, sytisiinin ja tutkittavien opioidien kykyä estää [3 H]-epibatidiinin sitoutumista α 4 β 2-nAChR:hin on esitetty kuvassa 15 ja taulukossa 2. Sytisiini esti voimakkaimmin 150 pM:n [3 H]-epibatidiinin sitoutumista α 4 β 2-nAChR:iin (K_i = 6,86 nM). Nikotiini esti [3 H]-epibatidiinin sitoutumista hieman sytisiiniä heikommin (K_i = 47,04 nM), mutta huomattavasti opioideja voimakkaammin. Opioideista oksikodoni (K_i = 0,296 mM) esti voimakkaimmin [3 H]-epibatidiinin reseptorisitoutumista, mutta ero kodeiniin oli pieni (K_i = 0,389 mM). Tramadoli esti [3 H]-epibatidiinin sitoutumista huomattavasti muita opioideja heikommin, ainoastaan suurimmilla pitoisuuksilla.

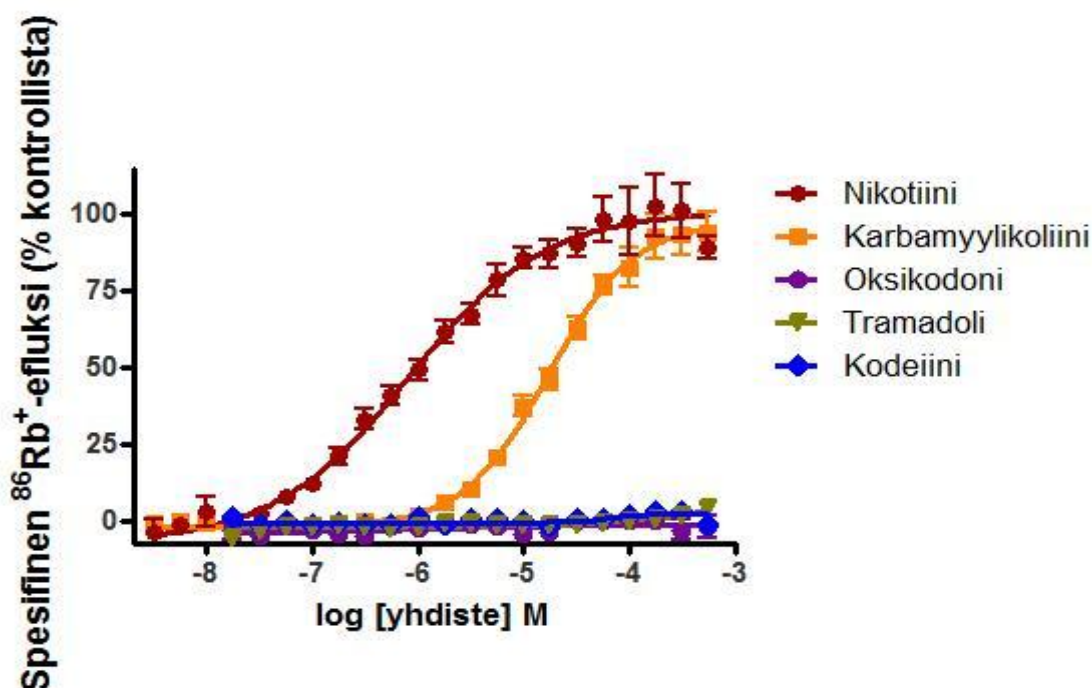


Kuva 15. Kilpailevan sitoutumisen tulokset (keskiarvo \pm SEM, n = 3). Sytisiini esti 150 pM [3 H]-epibatidiinin sitoutumisen α 4 β 2-nAChR:iin voimakkaimmin (K_i = 6,86 nM). Nikotiini (K_i = 47,04 nM) syrjäytti [3 H]-epibatidiinin sytisiiniä heikommin, mutta selvästi opioideja voimakkaammin. Oksikodoni (K_i = 0,296 mM) oli hieman kodeiniä (K_i = 0,296 mM) tehokkaampi. Tramadoli ei syrjäyttänyt [3 H]-epibatidiinia käytännössä lainkaan.

4.3 $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtausstimulaatio

Nikotiinin, karbamyylikoliinin ja tutkittavien opioidien $^{86}\text{Rb}^+$ -stimulaation tulokset on esitetty kuvassa 16. Nikotiini ja karbamyylikoliini aktivoivat α 4 β 2-reseptoreja saaden aikaan 100 % reseptoristimulaation kontrolliin verrattuna suhteellisen pienillä

pitoisuuksilla. Tuloksista lasketut EC_{50} -arvot olivat nikotiinille 0,65 μ M ja karbamyylikoliinille 17 μ M (Taulukko 2). Kodeiini, oksikodoni ja tramadoli eivät saaneet aikaan $\alpha 4\beta 2$ -nAChR aktivaatiota.



Kuva 16. $^{86}\text{Rb}^+$ -stimulaation tulokset kontrolliin (1 mM karbamyylikoliini) nähden (keskiarvo \pm SEM, $n = 3$). Nikotiini aktivoi SH-EP1-h $\alpha 4\beta 2$ -solujen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ja tutkituista yhdisteistä voimakkaimmin ($EC_{50} = 0,83 \mu\text{M}$). Karbamyylikoliini aktivoi $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ja nikotiinia heikommin ($EC_{50} = 17,23 \mu\text{M}$). Oksikodoni, tramadoli ja kodeiini eivät saaneet aikaan $\alpha 4\beta 2$ -nAChR-aktivaatiota.

4.4 Opioidien vaikutus kasvavan nikotiinipitoisuuden aiheuttamaan $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtaukseen

Kodeiinin, oksikodonin ja tramadolin mahdollisesti aiheuttamaa muutosta nikotiinin EC_{50} -arvoon testattiin käyttämällä $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtaus-menetelmässä kasvavaa nikotiini- ja tasaista opioidien tai mekamyliamiinin pitoisuutta. Kokeiden tulokset on esitetty kuvassa 17. nAChR:ien kilpailematon antagonisti mekamyliamiini laski sekä 1 μM että 10 μM pitoisuuksilla nikotiinin vasteen alle neljänneksen kontrollista (Kuva 17A), mutta se ei vaikuttanut nikotiinin EC_{50} -arvoon. Oksikodoni esti nikotiinin vastetta 10 ja 100 μM pitoisuudella suhteellisen vähän (Kuva 17C), ja 10 μM :n pitoisuuden aiheuttama nikotiinivasteen estyminen oli samansuuruinen kuin 10 μM :lla tramadolilla

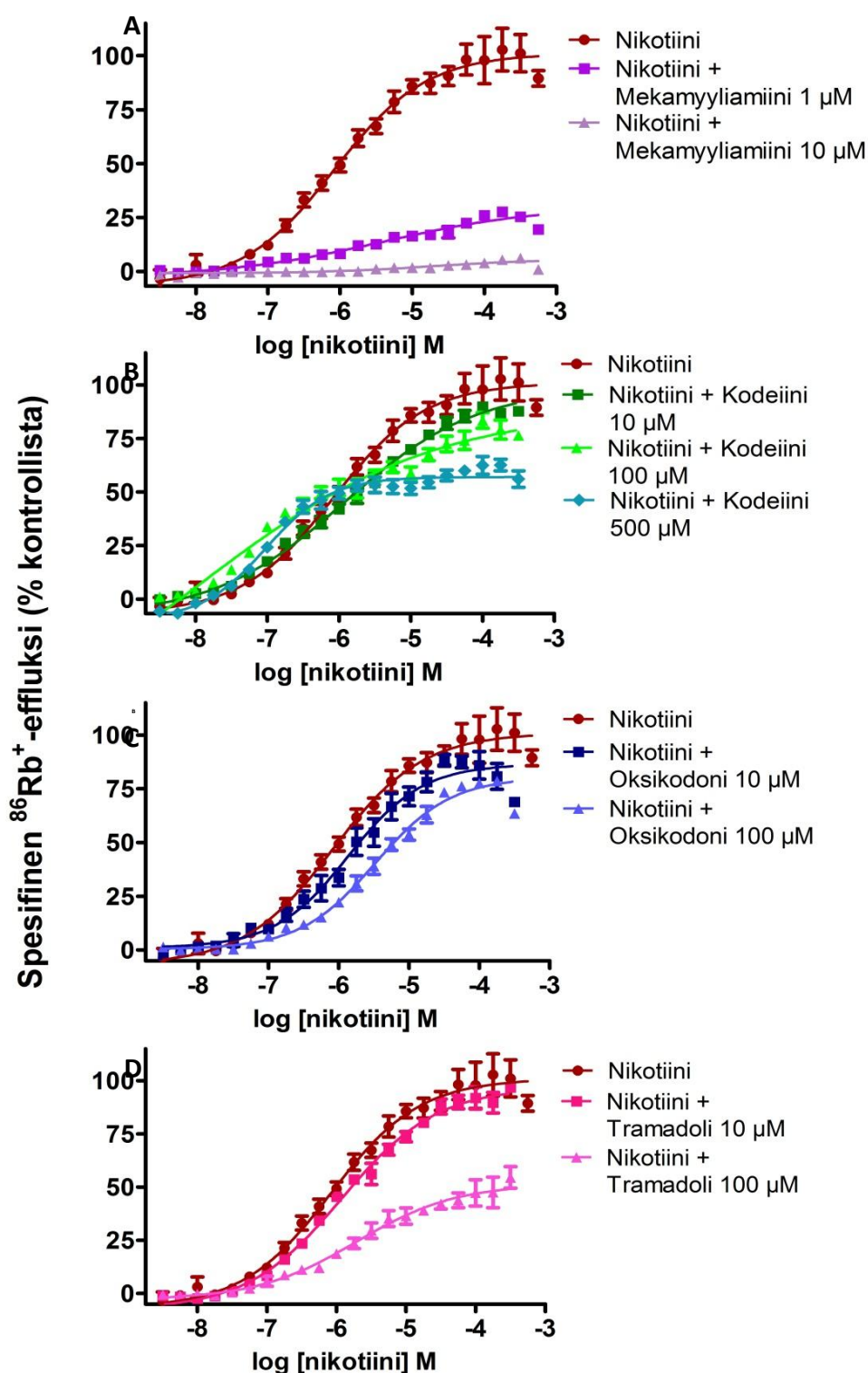
(Kuva 17D). 100 μM tramadoli esti nikotiinin maksimivasteen syntymistä kuitenkin selvästi kodeiinia ja oksikodonia tehokkaammin. Oksikodoni ja tramadoli eivät vaikuttaneet nikotiinin EC_{50} -arvoon merkittävästi, viitaten mekamylyliamiinin kaltaiseen kilpailemattomaan antagonismiin.

Kodeiinin vaikutus nikotiinin aiheuttamaan $\alpha 4\beta 2$ -nAChR -vasteeseen poikkesi selvästi oksikodonin, tramadolin ja mekamylyliamiinin vaikutuksesta (Kuva 17B). Vielä 10 μM pitoisuudella kodeiini ei vaikuttanut nikotiinin EC_{50} -arvoon ja annosvaste oli samankaltainen kuin kodeiinilla ja tramadolilla. 100 μM kodeiinipitoisuus kuitenkin voimisti nikotiinin aiheuttamaa reseptoriaktivaatiota pienillä, korkeintaan mikromolaarisilla pitoisuuksilla (Kuva 17B). Kyseinen kodeiinipitoisuus muutti nikotiinin EC_{50} -arvoa 0,83 μM :sta 0,011 μM :iin. Ilmiön vahvistamiseksi kodeiinista käytettiin myös 500 μM :n pitoisuutta, jolla nikotiinin EC_{50} -arvo pieneni 0,094 μM :iin.

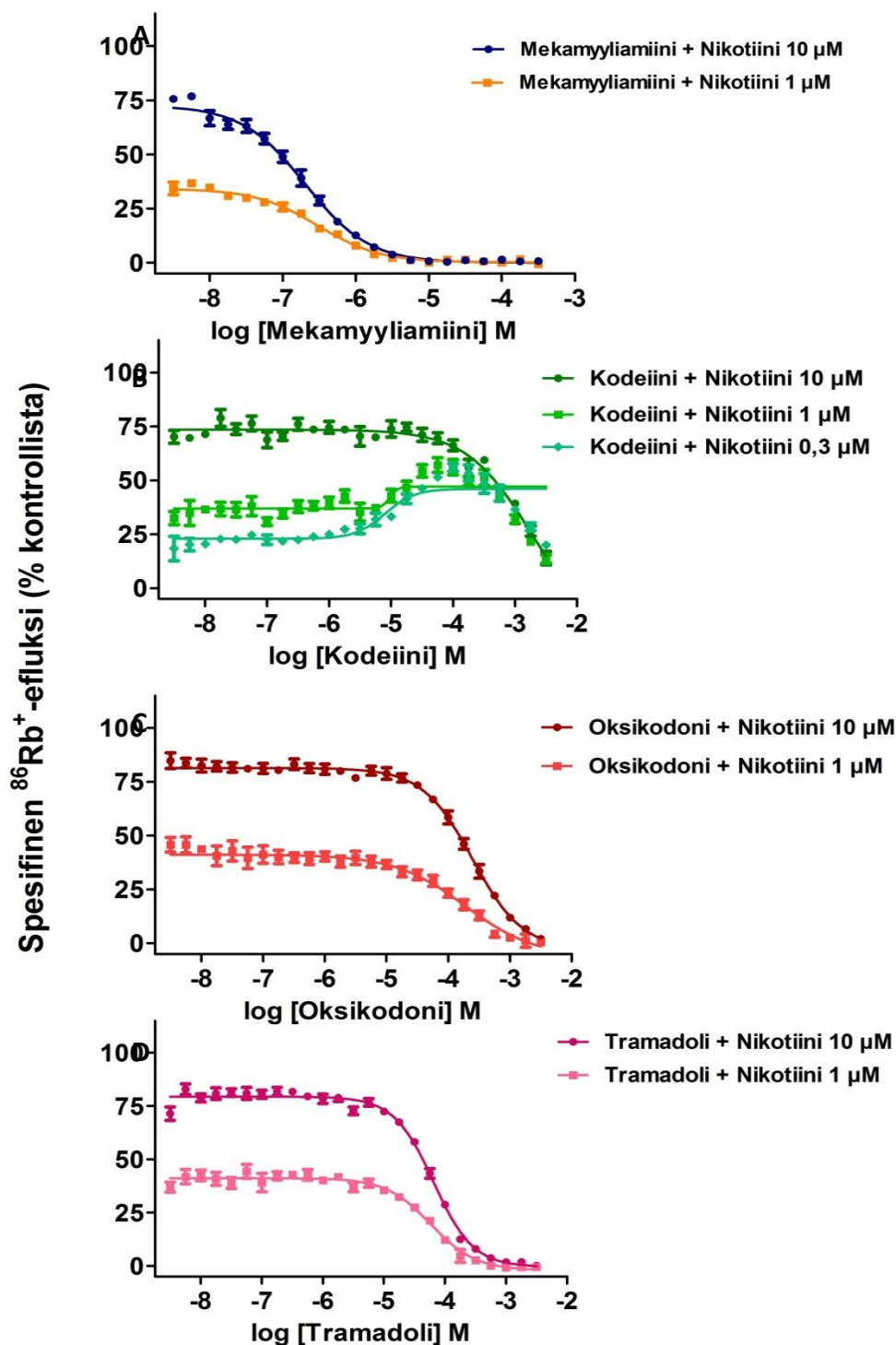
4.5 Kasvavan opioidipitoisuuden vaikutus nikotiinin aiheuttamaan $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtaukseen

Tutkittavien opioidien IC_{50} -arvot määritettiin $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtaus-menetelmällä käyttämällä opioideista ja mekamylyliamiinista kasvavaa ja nikotiinista tasaisia 1 μM ja 10 μM pitoisuuksia. Tulokset on esitetty kuvassa 18. Mekamylyliamiinin IC_{50} -arvot ovat samansuuruisia kuin kirjallisuudessa esiintyvät arvot (Kuva 18A, Taulukko 2) (Talka ym. julkaisematon havainto 2012). Oksikodoni (Kuva 18C) ja tramadoli (Kuva 18D) estivät nikotiinin vasteen täydellisesti millimolaarisilla pitoisuuksilla ja niiden IC_{50} -arvot olivat huomattavasti suuremmat kuin mekamylyliamiinilla (Kuva 18A, Taulukko 2).

Kodeiinin vaikutus nikotiinin aiheuttamaan reseptoriaktivaatioon oli jälleen oksikodonista ja tramadolista poikkeava (Kuva 18B). Kodeiini esti heikosti 10 μM nikotiinipitoisuutta (Taulukko 2). Sen sijaan pienempien, 1 μM ja 0,3 μM nikotiinipitoisuuksien aikaansaamaa vastetta kodeiini voimisti mikromolaarisilla pitoisuuksilla (Kuva 18B). Suoritetuissa kokeissa kodeiini toimii $\alpha 4\beta 2$ -nAChR antagonistina vasta millimolaarisilla pitoisuuksilla



Kuva 17. Tutkittujen yhdisteiden vaikutus nikotiinistimulaatioon SH-EP1-h α 4 β 2-soluissa $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtauskokeessa (keskiarvo \pm SEM, $n = 3$). Nikotiinin vastetta tutkittiin yksinään sekä mekamyyliamiinin (A), kodeiinin (B), oksikodonin (C) ja tramadolin (D) kanssa. Kontrollina käytettiin 1 mM karbamyylikoliiniliuosta. Arvot on esitetty muodossa keskiarvo \pm SEM.



Kuva 18. $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtauksen annos-vastekuvaajat tasaisen nikotiini- ja kasvavan opioidiligandin kokeessa SH-EP1-hä4 β 2-soluissa (keskiarvo \pm SEM, $n = 3$). Spesifinen $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtaus määritettiin tasaisella nikotiinipitoisuudella mekamyyliamiinin (A), kodeiinin (B), oksikodonin (C) tai tramadolin (D) läsnä ollessa. Kontrollina käytettiin 1 mM karbamyylikoliiniliuosta. Arvot on esitetty muodossa keskiarvo \pm SEM. IC_{50} -arvot on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Sitoutumis- ja $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtauskokeiden tulokset (keskiarvo, $n = 3$ (kilpaileva sitoutuminen), $n = 4$ ($^{86}\text{Rb}^+$ -stimulaatio), $n = 3$ ($^{86}\text{Rb}^+$ -antagonismikoe)). Kilpailevan sitoutumisen tuloksista ilmoitetaan K_i -arvo, joka ilmaisee yhdisteen pitoisuuden, joka estää [^3H]-epibatidiinin sitoutumisen 50 %:sti. EC_{50} -arvo ilmaisee agonistin pitoisuuden, jolla saadaan aikaan 50 % vaste. IC_{50} -arvo puolestaan kertoo antagonistin pitoisuuden, joka estää 50 % agonistin maksimivasteesta. NA = ei mitattavissa, - = yhdistettä ei käytetty.

| | Kilpaileva sitoutuminen [^3H]-epibatidiinilla | | $^{86}\text{Rb}^+$-ulosvirtausstimulaatio | |
|-------------------|---|---|---|---|
| Yhdiste | K_i (μM) | $\log K_i$ | EC_{50} (μM) | $\log \text{EC}_{50}$ |
| Nikotiini | 0,047 | $-7,327 \pm 0,026$ | 0,83 | $-6,081 \pm 0,043$ |
| Sytisiini | 0,0069 | $-0,816 \pm 0,028$ | - | - |
| Karbamyylikoliini | - | - | 17,23 | $-4,764 \pm 0,02$ |
| Kodeiini | 389 | $-3,410 \pm 0,032$ | NA | NA |
| Oksikodoni | 296 | $-3,528 \pm 0,019$ | NA | NA |
| Tramadoli | NA | NA | NA | NA |
| | Nikotiinin (10 μM ja 1 μM) vasteen estävät IC_{50}- arvot (μM) $\log \text{IC}_{50}$- arvot | | | |
| Yhdiste | Nikotiini 10 μM | Nikotiini 1 μM | Nikotiini 10 μM | Nikotiini 1 μM |
| Mekamyyliamiini | 0,203 | 0,299 | $-6,692 \pm 0,456$ | $-6,524 \pm 0,309$ |
| Kodeiini | 1 721 | NA | $-2,764 \pm 0,243$ | NA |
| Oksikodoni | 246 | 189 | $-3,608 \pm 0,030$ | $-3,723 \pm 0,088$ |
| Tramadoli | 64,67 | 58,72 | $-4,189 \pm 0,017$ | $-4,231 \pm 0,036$ |

5 POHDINTA

Erikoistyössä tarkoituksena oli tutkia nikotiinin ja opioidien (kodeiini, oksikodoni ja tramadoli) suoria, reseptoritasen interaktioita $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:eilla. Vaikka kyseisillä yhdisteillä suoritettuja vastaavanlaisten kokeiden tuloksia ei ole julkaistu, on aiemmin muilla yhdisteillä suoritetuissa kokeissa saatu viitteitä interaktioiden esiintymiselle (Sabey ym. 1998; Almeida ym. 2000; Feng ym. 2011; Talka ym. julkaisematon havainto 2012). Etenkään oksikodonilla interaktioita ei ole tutkittu ja julkaistu juuri lainkaan, eikä kodeiinilla ja tramadolilla suoritettuja tutkimuksia ole julkaistu paljoa.

Siksi erikoistytön tulokset ovat ensimmäisiä laatuaan ja antavat arvokasta lisätietoa näiden yhdisteiden vaikutuksista keskushermoston $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:hin.

Tramadoli ei kyennyt syrjäyttämään [^3H]-epibatidiinia sen sitoutumiskohdasta $\alpha 4\beta 2$ -reseptorissa (Kuva 15, Taulukko 2). Tulosten perusteella tramadoli ei sitoudu ainakaan samaan kohtaan reseptoria kuin epibatidiini ja nikotiini. Se ei kyennyt myöskään aktivoimaan $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ia $^{86}\text{Rb}^+$ -stimulaatio kokeessa (Kuva 16). Testattaessa tramadolin vaikutusta 1 μM :n ja 10 μM :n nikotiinin aiheuttamaan $\alpha 4\beta 2$ -nAChR vasteeseen, yhdiste osoittautui estävän molempia nikotiinipitoisuuksia kutakuinkin yhtä tehokkaasti (Kuva 18D, Taulukko 2). Tramadolin IC_{50} -arvot 1 μM ja 10 μM nikotiinipitoisuuksille olivat kuitenkin yli satakertaisia tunnettuun, kilpailemattomaan nAChR antagonisti mekamyliamiiniin verrattuna (Kuva 18A, Taulukko 2). Nikotiinistimulaatiosta saatuun nikotiinin EC_{50} -arvoon tramadoli ei puolestaan vaikuttanut (Kuva 17D). Tältä osin yhdiste muistutti mekamyliamiinia. Tulosten perusteella tramadoli on ihmisen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:n heikko kilpailematon antagonisti *in vitro*. Tramadoli on osoittautunut aikaisemmissa *in vitro*-kokeissa kanan $\alpha 7$ -nAChR-antagonistiksi heterogeenisessä systeemissä (Shiraishi ym. 2002). Viitteitä interaktioista $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:n kanssa ei aikaisemmin kuitenkaan ole saatu.

Ihmisillä tramadolin plasman maksimipitoisuuden (C_{max}) on todettu kohoavan niin kerta-annoksen kuin toistuvan, 60 – 100 mg:n annoksen annostelun jälkeen noin 1 μM pitoisuuteen (Karhu ym. 2010; di Freitas Silva ym. 2011; Yi ym. 2011). Erikoistytön tulosten perusteella tramadolilla ei siten todennäköisesti esiintyisi kliinisesti merkittäviä interaktioita $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ien kanssa *in vivo* (Kuva 17D, Kuva 18D, Taulukko 2). Jotta asiasta saisi varmuuden, tulisi yhdisteellä suorittaa kokeita myös *in vivo*. Saadut tulokset eivät kuitenkaan anna suurta perustetta jatkotutkimuksille.

Oksikodoni on puolisynteettinen, voimakkaan kivun lievityksessä käytettävä morfiinin johdos. Kirjallisuudesta ei löydy viitteitä oksikodonin ja nikotiinin interaktioiden tutkimisesta *in vitro* nAChR:lla. Oksikodonin väärinkäyttöä esiintyy suhteellisesti yhtä paljon kuin muidenkin opioidien väärinkäyttöä ja havainnot viittaavat siihen, että myös oksikodonin väärinkäyttäjät tupakoivat muuta väestöä enemmän (Cicero ym. 2011.)

Oksikodoni kilpaili [^3H]-epibatidiinin kanssa samasta sitoutumispaikasta vasta reilusti yli mikromolaarisilla pitoisuuksilla (Kuva 15, Taulukko 2). Oksikodoni ei myöskään kyennyt aktivoimaan $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ja $^{86}\text{Rb}^+$ -stimulaatiokokeessa, joten yhdiste ei toimi $\alpha 4\beta 2$ -nAChR-agonistina. Oksikodoni esti sekä 1 μM :n ja 10 μM :n nikotiinin aiheuttaman reseptoriaktivaation heikosti mekamyylamiinin verrattuna; yhdiste oli noin 100 kertaa mekamyylamiinia heikompi $\alpha 4\beta 2$ -nAChR antagonisti (Kuva 18C, Taulukko 2). Mekamyylamiinin tavoin oksikodoni ei vaikuttanut nikotiinin EC_{50} -arvoon, joten erikoistytön tulosten perusteella oksikodoni on heikko kilpailematon $\alpha 4\beta 2$ -nAChR-estäjä *in vitro* (Kuva 17C). Oksikodonin C_{max} -pitoisuudet jäivät kliinisessä käytössä selvästi erikoistytössä vasteen aikaan saamia pitoisuuksia matalammiksi (Nieminen ym. 2010; Liukas ym. 2011). Erikoistytön tuloksilla ei ole siksi oksikodonin osalta välttämättä merkitystä *in vivo* eivätkä tulokset anna suoraa aihetta interaktioiden tutkimiselle myös eläimillä.

Kodeiini esti [^3H]-epibatidiinin sitoutumisen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ään kilpailevan sitoutumisen kokeessa samankaltaisesti kuin oksikodoni (Kuva 15, Taulukko 2). Yhdiste poikkesi kuitenkin selvästi tramadolista ja oksikodonista $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ien toiminnallisessa $^{86}\text{Rb}^+$ -kokeessa. Kodeiini ei kyennyt aktivoimaan $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ja $^{86}\text{Rb}^+$ -stimulaatiokokeessa (Kuva 16), mutta käytettäessä tasaista 1 μM :n ja 0,3 μM :n nikotiinipitoisuutta, kodeiini voimisti nikotiinin reseptorivastetta mikromolaarisilla pitoisuuksilla (Kuva 18B). 10 μM :n nikotiinipitoisuutta kodeiini ei voimistanut. Sen sijaan millimolaarisilla pitoisuuksilla kodeiini käyttäytyi nAChR-antagonistin tavoin kilpailevan sitoutumisen kokeen kaltaisesti. Lisäksi 100 μM :n ja 500 μM :n kodeiinipitoisuus pienensi nikotiinin EC_{50} -arvoa, jolloin pienempi nikotiinipitoisuus tuotti suuremman vasteen näiden kodeiinipitoisuuksien kanssa kuin ilman (Kuva 17B). Kuitenkin nikotiinipitoisuuden kasvaessa yli 1 μM :n kodeiini ei saanut aikaan nikotiinin reseptorivasteen voimistumista.

Aikaisemmin suoritettussa, kloonatuilla rotan lisämunuaisytimen kasvaimesta eristetyillä, PC12-soluilla suoritettussa *in vitro* tutkimuksessa kodeiinin todettiin aktivoivan soluja itsestään sekä voimistavan matalien ACh:n pitoisuuksien

aikaansaamaa nikotiinireseptoriaktivaatiota patch clamp-menetelmällä mitattuna (Storch ym. 1995). Kodeiini sai aikaan nAChR:n allosteerinen agonisti galantamiinin ja asetyylikoliiniesteraasin estäjän (AChEI) fysostigmiinin kaltaisen vasteen. Yhdisteet eivät saaneet kuitenkaan yksistään aikaan merkittävää reseptoriaktivaatiota, mutta niiden ACh:n vastetta voimistava vaikutus oli huomattava. Reseptorisitoutuminen tapahtui eri kohdassa nAChR:a kuin ACh:lla, sillä kilpaileva nAChR-antagonisti metyyllilykoniini ei estänyt havaittua suoraa reseptoriaktivaatiota. PC12-solujen todettiin ilmentävän nikotiinireseptoreja, jotka muodostuvat pääasiassa $\alpha 7$, $\alpha 4$ ja $\beta 2$ nAChR-alayksiköitä. Kokeissa ei kuitenkaan voitu osoittaa, että mitattu reseptoriaktivaatio olisi välittynyt juuri näitä alayksiköitä sisältäneiden nAChR:ien kautta. Lisäksi ihmisen ja rottien nAChR-alayksiköt eivät ole rakenteeltaan täysin identtisiä. Useista puutteistaan huolimatta kyseisen tutkimuksen tulokset antavat viitteitä kodeiinin suorasta interaktiosta nAChR:ien kanssa. Toisaalta, HN42-soluilla tehdyssä tutkimuksessa kodeiinin ei havaittu *in vitro* voimistavan asetyylikoliinin aiheuttamaa vastetta kokosolu-patch-clamp-menetelmällä mitattuna (Sabey ym. 1998). Solulinja koostuu ihmisen epiteelisolulinja HEK293-soluista, joihin on siirretty cDNA-tekniikalla rotan $\alpha 4\beta 2$ -nAChR geeni. Tulokset saattoivat erota toisistaan siksi, että Storchin tutkimusryhmän aikaisempien kokeiden tulokset johtuivat muun kuin $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:n aktivaatioista.

Plasman kodeiinipitoisuudet voivat vaihdella väestössä merkittävästi samansuuruisen lääkeannoksen nauttimisen jälkeen, sillä se metaboloituu aktiiviseksi morfiiniksi maksan CYP 2D6-entsyymien kautta (Yue ym. 1989). Entsyymillä esiintyy väestössä runsaasti geneettistä polymorfiaa. Plasman huippupitoisuudeksi suun kautta otetun 60 mg:n kodeiinifosfaatin kerta-annoksen jälkeen on määritetty 0,233 μM (Rogers ym. 1982). Vastaavia pitoisuuksia löytyy kirjallisuudesta (Quiding ym. 1986). Lisäksi tupakoinnin on havaittu nostavan plasman kodeiinin huippupitoisuutta oraalisen annostelun jopa noin 50 %, mahdollisesti CYP 2D6-eston kautta (Rogers ym. 1982). Toistuvalla, seitsemän päivän annostelulla plasman kodeiinipitoisuus ei juuri nouse kerta-annoksen huippupitoisuutta korkeammaksi (Quiding 1986). Vastaavansuuruisilla kodeiinipitoisuuksilla havaittiin nikotiinin aikaansaaman vasteen voimistumista $^{86}\text{Rb}^{+}$ -ulosvirtauskokeessa (Kuva 18B). Rotilla suoritetuissa mikrodialyysikokeissa on

puolestaan todettu, että aivojen ja plasman kodeiinipitoisuudet ovat keskenään samansuuruisia (Xie ja Hammarlund-Udenaes 1998).

Erikoistyön tulosten perusteella kodeiini toimii humaanityypin $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:n positiivisena allosteerisena modulaattorina. Kahden aikaisemmin *in vitro* -kokeen tuloksia ei voi verrata erikoistyön tuloksiin täysin suoraan, sillä käytetyt menetelmät – elektrofysiologiaa tutkiva patch clamp -menetelmä ja ionikanavareseptorien aktivoitumista suoraan kuvaava, $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtaus-menetelmä – eivät ole keskenään vastaavia. Elektrofysiologisissa kokeissa solun muiden ionikanavien aukeaminen tai sulkeutuminen voi muuttaa solun elektrofysiologista vastetta antaen osin epäluotettavia tuloksia. $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtaus-menetelmän on puolestaan todettu olevan spesifinen nAChR:ien vasteen tutkimiselle (Lukas ym. 2002). Erikoistyön tulokset johtuvat siten juuri $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ien toiminnallisista vasteista, sillä SH-EP1- $\alpha 4\beta 2$ -solut eivät ilmennä muita nAChR-alatyyppejä (Eaton ym. 2003). Toisaalta erikoistyössä käytetty solulinja ei kuvasta luonnollisesti keskushermostossa eikä muuallakaan elimistössä esiintyviä soluja. Sen vuoksi tuloksista ei voi vetää suoria johtopäätöksiä kliinisesti mahdollisesti esiintyviin interaktioihin kodeiinin ja nikotiinin välillä keskushermostossa. Kodeiinin ja nAChR:ien interaktioita esiintyi erikoistyössä kuitenkin kodeiinipitoisuuksilla, joihin on mahdollista päästä kliinisesti käytetyillä kodeiiniannoksilla (Rogers ym 1982; Quidin ym. 1986). Tupakoivien plasman nikotiinipitoisuuksien on puolestaan havaittu vaihtelevan suuresti tupakoivien välillä, mutta niiden on todettu nousevan yksittäisillä tupakoijilla 25 – 444 nM:iin ja keskimäärin noin 200 nM:iin (Russell ym. 1980). Erikoistyössä tuloksia saatiin kuitenkin tätä suuremmilla nikotiinipitoisuuksilla. Nikotiinin tiedetään kuitenkin kertyvän tupakoivien henkilöiden kudoksiin, mukaan lukien aivoihin (Perry ym. 1999). Siten aivojen nikotiinipitoisuus saattaa olla plasman nikotiinipitoisuutta korkeampi pitkäaikaisen nikotiinialtistuksen seurauksena.

Kodeiinilla saadut tulokset antavat perusteen selvittää ilmiön mahdollisen esiintymisen *in vivo*. Jotta ilmiön esiintyminen *in vivo* voidaan varmistaa, tulisi opioidien ja nikotiinin interaktioita tutkia esimerkiksi jyrksijämalleilla. Käyttämällä esimerkiksi sekä villityypin että $\alpha 4$ - ja $\beta 2$ -poistogeenisiä hiiriä, voidaan kodeiinin vaikutusta tutkia

yhtäaikaaisesti annostellun nikotiinin kanssa. Tutkimuksilla voidaan selvittää, esiintyykö kodeiinilla mahdollisesti galantamiinin kaltaista, $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ien kautta aiheutuvaa vastetta muistia mittaavissa käyttäytymiskokeissa. Lisäksi kodeiinin mahdollista osallisuutta $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:ien kautta välittyvää kivun lievittymistä voidaan mitata sopivilla käyttäytymiskokeilla.

6 YHTEENVETO

Erikoistyon tavoitteet voidaan katsoa täytetyiksi ja saadut tulokset ovat ensimmäisiä laatuaan. Erikoistyössä osoitettiin, että kivun hoidossa käytettävät opioidit kodeiini, oksikodoni ja tramadoli sitoutuvat *in vitro* ihmisen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:hein spesifisesti kyseisiä nAChR:ja ilmentävissä SH-EP1-h $\alpha 4\beta 2$ -soluissa [^3H]-epibatidiinin kilpailevan sitoutumisen kokeessa. $^{86}\text{Rb}^+$ -ulosvirtauskokeessa oksikodoni ja tramadoli toimivat nikotiinin heikkoina kilpailevina antagonisteina $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:illa. Kodeiini osoittautui puolestaan $\alpha 4\beta 2$ -nAChR:n heikoksi positiiviseksi allosteeriseksi modulaattoriksi *in vitro* voimistamalla nikotiinin aikaansaamaa nAChR:ien aktivoitumista. Kodeiinilla on saatu vastaavanlaisia tuloksia aikaisemmin eri koeasetelmassa.

Oksikodonin ja tramadolin plasman C_{max} -arvojen on havaittu jäävän erikoistyon kokeissa vasteen aikaansaamia pitoisuuksia pienemmiksi kliinisesti käytössä olevilla lääkeannoksilla (Karhu ym. 2010; Nieminen ym. 2010; di Freitas Silva ym. 2011; Liukas ym. 2011; Yi ym. 2011). Kliinisesti käytettävillä kodeiiniannoksilla sen plasman C_{max} -arvot puolestaan voivat kuitenkin nousta yhtä korkeiksi ihmisillä, kuin pitoisuudet joilla erikoistyon kokeissa aikaansatiin edellä kuvatut vasteet (Rogers ym. 1982; Quidin ym. 1986). Plasman nikotiinipitoisuudet eivät sen sijaan nouse ihmisillä samansuuruisiksi, kuin pitoisuudet joita erikoistyössä käytettiin (Russel ym. 1980). Kodeiinin aikaansaama vaste saattaa olla kliinisesti merkittävä. Asian varmistamiseksi tulee kuitenkin suorittaa lisäkokeita *in vivo*.

7 KIITOKSET

Haluan kiittää professori Raimo K. Tuomista mahdollisuudesta suorittaa erikoistyö Helsingin yliopiston Farmasian tiedekunnan Farmakologian ja toksikologian osastolla sekä koko osaston henkilökuntaa. Erityskiitokset kuuluvat erikoistyön ohjaajalleni Reeta Talkalle sekä tutkimusryhmän johtajalle, dosentti Outi Salmiselle.

KIRJALLISUUSLUETTELO

Abdin MJ, Morioka N, Morita K, Kitayama T, Kitayama S, Nakashima T: Analgesic action of nicotine on tibial nerve transection (TNT)-induced mechanical allodynia through enhancement of the glycinergic inhibitory system in spinal cord. *Life Sci* ;80: 9-16, 2006

Abols IA, Basbaum AI: Afferent connections of the rostral medulla of the cat: A neural substrate for midbrain-medullary interactions in the modulation of pain. *J Comp Neurol* 201: 285-297, 1981

Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM: Endogenous opioids: Biology and function. *Annu Rev Neurosci* 7: 223-255, 1984

Albuquerque EX, Pereira EF, Mike A, Eisenberg HM, Maelicke A, Alkondon M: Neuronal nicotinic receptors in synaptic functions in humans and rats: Physiological and clinical relevance. *Behav Brain Res* 113: 131-141, 2000

Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: From structure to function. *Physiol Rev* 89: 73-120, 2009

Almeida LE, Pereira EF, Alkondon M, Fawcett WP, Randall WR, Albuquerque EX: The opioid antagonist naltrexone inhibits activity and alters expression of alpha7 and alpha4beta2 nicotinic receptors in hippocampal neurons: Implications for smoking cessation programs. *Neuropharmacology* 39: 2740-2755, 2000

Azam L, Winzer-Serhan U, Leslie FM: Co-expression of alpha7 and beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience* 119: 965-977, 2003

Badio B, Daly JW: Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist. *Mol Pharmacol.* 45: 563-569, 1994

Bajic D, Proudfit HK: Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. *J Comp Neurol* 1999 405: 359-379, 1999

Baron R: Neuropathic Pain: A Clinical Perspective. *Handb Exp Pharmacol* 194: 3-30, 2009

Basbaum AI, Cruz L, Weber E: Immunoreactive dynorphin B in sacral primary afferent fibers of the cat. *J Neurosci* 6: 127-133, 1986

Basbaum AI, Fields HL: Endogenous pain control mechanisms: Review and hypothesis. *Ann Neurol* 1978 4: 451-462, 1987

Baumhaker Y, Gafni M, Keren O, Sarne Y: Selective and interactive down-regulation of mu- and delta-opioid receptors in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Mol Pharmacol* 44: 461-467, 1993

Benowitz NL: Pharmacology of nicotine: Addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 49: 57-71, 2009

Benwell ME, Balfour DJ: The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. *Br J Pharmacol* 105: 849-856, 1992

Berrendero F, Kieffer BL, Maldonado R: Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in mu-opioid receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22: 10935-10940, 2002

Berrendero F, Mendizabal V, Robledo P, Galeote L, Bilkei-Gorzo A, Zimmer A, Maldonado R: Nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and physical dependence are decreased in mice lacking the preproenkephalin gene. *J Neurosci* 25: 1103-1112, 2005

Berrendero F, Robledo P, Trigo JM, Martin-Garcia E, Maldonado R: Neurobiological mechanisms involved in nicotine dependence and reward: Participation of the endogenous opioid system. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 220-231, 2010

Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Bertrand S, Changeux JP: Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 6971-6975, 1993

Besse D, Lombard MC, Zajac JM, Roques BP, Besson JM: Pre-and postsynaptic distribution of μ , δ and κ opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res* 521: 15-22, 1990

Bicknell AB. The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. *J Neuroendocrinol* 20: 692-699, 2008

Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS: Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38: 3751-3757, 1978

Bodnar RJ: Endogenous opiates and behavior: 2010. *Peptides* 32: 2522-2552, 2011

Bonci A, Williams JT: Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *J Neurosci* 17: 796-803, 1997

Bradford MM: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976

- Brenchat A, Romero L, Garcia M, Pujol M, Burgueno J, Torrens A, Hamon M, Baeyens JM, Buschmann H, Zamanillo D, Vela JM: 5-HT₇ receptor activation inhibits mechanical hypersensitivity secondary to capsaicin sensitization in mice. *Pain* 141: 239-247, 2009
- Brownstein MJ: A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 5391-5393, 1993
- Cao YJ, Surowy CS, Puttfarcken PS: Nicotinic acetylcholine receptor-mediated [3H]dopamine release from hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 1298-1304, 2005
- Chait LD, Griffiths RR: Effects of methadone on human cigarette smoking and subjective ratings. *J Pharmacol Exp Ther* 229: 636-640, 1984
- Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Lena C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novère N, McIntosh JM, Gardier AM, Changeux JP: Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci* 23: 7820-7829, 2003
- Chang KJ, Cooper BR, Hazum E, Cuatrecasas P: Multiple opiate receptors: Different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides. *Mol Pharmacol* 16: 91-104, 1979
- Changeux JP, Bertrand D, Corringer PJ, Dehaene S, Edelstein S, Lena C, Le Novère N, Marubio L, Picciotto M, Zoli M: Brain nicotinic receptors: Structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Rev* 26: 198-216, 1998
- Chavez-Noriega LE, Crona JH, Washburn MS, Urrutia A, Elliott KJ, Johnson EC: Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors h alpha 2 beta 2, h alpha 2 beta 4, h alpha 3 beta 2, h alpha 3 beta 4, h alpha 4 beta 2, h alpha 4 beta 4 and h alpha 7 expressed in xenopus oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 346-356, 1997
- Chefer VI, Czyzyk T, Bolan EA, Moron J, Pintar JE, Shippenberg TS: Endogenous kappa-opioid receptor systems regulate mesoaccumbal dopamine dynamics and vulnerability to cocaine. *J Neurosci* 25: 5029-5037, 2005
- Chefer VI, Kieffer BL, Shippenberg TS: Basal and morphine-evoked dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens of MOR- and DOR-knockout mice. *Eur J Neurosci* 18: 1915-1922, 2003
- Chen D, Patrick JW: The alpha-bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha7 subunit. *J Biol Chem* 272: 24024-24029, 1997
- Chevillard L, Megarbane B, Baud FJ, Risede P, Decleves X, Mager D, Milan N, Ricordel I: Mechanisms of respiratory insufficiency induced by methadone overdose in rats. *Addict Biol* 15: 62-80, 2010

Cicero TJ, Ellis MS, Paradis A, Ortbal Z: Role of key informants and direct patient interviews in epidemiological studies of substance abuse. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 20: 308-312, 2011

Clarke JG, Stein MD, McGarry KA, Gogineni A: Interest in smoking cessation among injection drug users. *Am J Addict* 10: 159-166, 2001

Cordero-Erausquin M, Changeux JP: Tonic nicotinic modulation of serotonergic transmission in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 2803-2807, 2001

Corrigall WA, Coen KM: Opiate antagonists reduce cocaine but not nicotine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 104: 167-170, 1991

Covey LS, Glassman AH, Stetner F: Naltrexone effects on short-term and long-term smoking cessation. *J Addict Dis* 18: 31-40, 1999

Creekmore FM, Lugo RA, Weiland KJ: Postoperative opiate analgesia requirements of smokers and nonsmokers. *Ann Pharmacother* 38: 949-953, 2004

Creese I, Snyder SH: Receptor binding and pharmacological activity of opiates in the guinea-pig intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 194: 205-219, 1975

Cucchiario G, Chaijale N, Commons KG: The locus coeruleus nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the nicotinic receptor agonist, epibatidine. *Neuropharmacology* 50: 769-776, 2006

Cucchiario G, Chaijale N, Commons KG: The dorsal raphe nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the $\alpha 4$ nicotinic receptor agonist epibatidine. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 389-394, 2005

Cui M, Feng Y, McAdoo DJ, Willis WD: Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin, and amino acids. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 868-876, 1999

Dajas-Bailador F, Wonnacott S: Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* 25: 317-324, 2004

Dajas-Bailador FA, Mogg AJ, Wonnacott S: Intracellular Ca^{2+} signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: Contribution of voltage-operated Ca^{2+} channels and Ca^{2+} stores. *J Neurochem* 81: 606-614, 2002

Damaj MI, Fei-Yin M, Dukat M, Glassco W, Glennon RA, Martin BR: Antinociceptive responses to nicotinic acetylcholine receptor ligands after systemic and intrathecal administration in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 284: 1058-1065, 1998

Damaj MI, Flood P, Ho KK, May EL, Martin BR: Effect of dextrometorphan and dextrorphan on nicotine and neuronal nicotinic receptors: In vitro and in vivo selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 780-785, 2005

Damaj MI, Meyer EM, Martin BR: The antinociceptive effects of alpha7 nicotinic agonists in an acute pain model. *Neuropharmacology* 39: 2785-2791, 2000

Dani JA, Bertrand D: Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 699-729, 2007

Dani JA, Heinemann S: Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron* 16: 905-908, 1996

Daumas S, Betourne A, Halley H, Wolfer DP, Lipp HP, Lassalle JM, Francés B: Transient activation of the CA3 kappa opioid system in the dorsal hippocampus modulates complex memory processing in mice. *Neurobiol Learn Mem* 88: 94-103, 2007

David S, Lancaster T, Stead LF, Evins AE: Opioid antagonists for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 4: 1-28, 2006

del Arbol JL, Munoz JR, Ojeda L, Cascales AL, Irls JR, Miranda MT, Ruiz Reuena ME, Aguirre JC: Plasma concentrations of beta-endorphin in smokers who consume different numbers of cigarettes per day. *Pharmacol Biochem Behav* 67: 25-28, 2005

de Freitas Silva M, Schramm SG, Kano EK, Mori Koono EE, Porta V, dos Reis Serra CH: Bioequivalence evaluation of single doses of two tramadol formulations: A randomized, open-label, two-period crossover study in healthy brazilian volunteers. *Clin Ther* 32: 758-765, 2010

de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 6: 844-851, 2005

DeNoble VJ, Mele PC: Intravenous nicotine self-administration in rats: Effects of mecamlamine, hexamethonium and naloxone. *Psychopharmacology (Berl)* 184: 266-272, 2006

Devine DP, Wise RA: Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *J Neurosci* 14: 1978-1984, 1994

Dhatt RK, Gudehithlu KP, Wemlinger TA, Tejawani GA, Neff NH, Hadjiconstantinou M: Preproenkephalin mRNA and methionine-enkephalin content are increased in mouse striatum after treatment with nicotine. *J Neurochem* 64: 1878-1883, 1995

Di Chiara G, Imperato A: Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5274-5278, 1988

- Doly S, Fischer J, Brisorgueil MJ, Verge D, Conrath M: Pre- and postsynaptic localization of the 5-HT₇ receptor in rat dorsal spinal cord: Immunocytochemical evidence. *J Comp Neurol* 490: 256-269, 2005
- Drisdell RC, Green WN: Neuronal alpha-bungarotoxin receptors are alpha7 subunit homomers. *J Neurosci* 20: 133-139, 2000
- Eaton JB, Peng JH, Schroeder KM, George AA, Fryer JD, Krishnan C, Buhlman L, Kuo YP, Steinlein O, Lukas RJ: Characterization of human alpha 4 beta 2-nicotinic acetylcholine receptors stably and heterologously expressed in native nicotinic receptor-null SH-EP1 human epithelial cells. *Mol Pharmacol* 64: 1283-1294, 2003
- Elkader AK, Brands B, Selby P, Sproule BA: Methadone-nicotine interactions in methadone maintenance treatment patients. *J Clin Psychopharmacol* 29: 231-238, 2009
- Fabian-Fine R, Skehel P, Errington ML, Davies HA, Sher E, Stewart MG, Fine A: Ultrastructural distribution of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *J Neurosci* 21: 7993-8003, 2001
- Feng B, Xing JH, Jia D, Liu SB, Guo HJ, Li XQ, He XS, Zhao MG: Blocking alpha4beta2 and alpha7 nicotinic acetylcholine receptors inhibits the reinstatement of morphine-induced CPP by drug priming in mice. *Behav Brain Res* 220: 100-105, 2011
- Ferbinteanu J, McDonald RJ: Dorsal/ventral hippocampus, fornix, and conditioned place preference. *Hippocampus* 11: 187-200, 2001
- Ferrari MF, Coelho EF, Farizatto KL, Chadi G, Fior-Chadi DR: Modulation of tyrosine hydroxylase, neuropeptide y, glutamate, and substance p in ganglia and brain areas involved in cardiovascular control after chronic exposure to nicotine. *Int J Hypertens* 2011: 1-9, 2011
- Fields HL: State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5: 565-575, 2004
- Fields HL, Heinricher MM, Mason P: Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci* 14: 219-245, 1991
- Filliol D, Ghazizadeh S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gavériaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL: Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet* 25: 195-200, 2000
- Finnerup NB, Sørensen HS, Jensen TS: Chronic neuropathic pain: mechanisms, drug targets and measurement. *Fundam Clin Pharmacol* 21: 129-136, 2007
- Flood P, Daniel D: Intranasal nicotine for postoperative pain treatment. *Anesthesiology* 101: 1417-1421, 2004

- Frazier CJ, Buhler AV, Weiner JL, Dunwiddie TV: Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *J Neurosci* 18: 8228-8235, 1998
- Frosch DL, Shoptaw S, Nahom D, Jarvik ME: Associations between tobacco smoking and illicit drug use among methadone-maintained opiate-dependent individuals. *Exp Clin Psychopharmacol* 8: 97-103, 2000
- Fucile S: Ca^{2+} permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35: 1-8, 2004
- Fucile S, Renzi M, Lax P, Eusebi F: Fractional Ca^{2+} current through human neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 34: 205-209, 2003
- Fukada T, Iwakiri H, Ozaki M: A randomised double-blind crossover trial of the potential analgesic effect of a transdermal nicotine patch in non-smokers based on objective and subjective assessment. *Eur J Anaesthesiol* 28: 592-596, 2011
- Galeote L, Kieffer BL, Maldonado R, Berrendero F: Mu-opioid receptors are involved in the tolerance to nicotine antinociception. *J Neurochem* 97: 416-423, 2006
- Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL: Opioid receptor genes inactivated in mice: The highlights. *Neuropeptides* 36: 62-71, 2002
- Gear RW, Aley KO, Levine JD: Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. *J Neurosci* 19: 7175-7181, 1999
- Girdler SS, Maixner W, Naftel HA, Stewart PW, Moretz RL, Light KC: Cigarette smoking, stress-induced analgesia and pain perception in men and women. *Pain* 114: 372-385, 2005
- Glazer EJ, Basbaum AI: Immunohistochemical localization of leucine-enkephalin in the spinal cord of the cat: Enkephalin-containing marginal neurons and pain modulation. *J Comp Neurol* 196: 377-389, 1981
- Gotti C, Clementi F: Neuronal nicotinic receptors: From structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74: 363-396, 2004
- Gotti C, Clementi F, Fornari A, Gaimarri A, Guiducci S, Manfredi I, Moretti M, Pedrazzi P, Pucci L, Zoli M: Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* 78: 703-711, 2009
- Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA: Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* 383: 713-716, 1996
- Griffiths J, Marley PD: Ca^{2+} -dependent activation of tyrosine hydroxylase involves MEK1. *Neuroreport* 12: 2679-2683, 2001

Gueorguiev VD, Zeman RJ, Hiremagalur B, Menezes A, Sabban EL: Differing temporal roles of Ca²⁺ and cAMP in nicotine-elicited elevation of tyrosine hydroxylase mRNA. *Am J Physiol* 276: 54-65, 1999

Gutstein HB, Rubie EA, Mansour A, Akil H, Woodgett JR: Opioid effects on mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Anesthesiology* 87: 1118-1126, 1997

Habib SA, White WD, El Gasim MF, Saleh G, Polascik TJ., Moul JW, Gan TJ: Transdermal nicotine for analgesia after radical retropubic prostatectomy. *Anesth Analg* 107: 999-1004, 2008

Hammond DL, Tyce GM, Yaksh TL: Efflux of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline into spinal cord superfusates during stimulation of the rat medulla. *J Physiol* 359: 151-162, 1985

Hammonds RG,Jr, Nicolas P, Li CH: Beta-endorphin-(1-27) is an antagonist of beta-endorphin analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1389-1390, 1984

Harlan RE, Shivers BD, Romano GJ, Howells RD, Pfaff DW: Localization of preproenkephalin mRNA in the rat brain and spinal cord by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 258: 159-184, 1987

Helakorpi S, Pajunen T, Jallinoja P, Virtanen S, Uutela A: Suomalaisen aikuisväestön terveystäyttyminen ja terveys, kevät 2010. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos 15/2011

Hernandez SC, Bertolino M, Xiao Y, Pringle KE, Caruso FS, Kellar KJ: Dextromethorphan and its metabolite dextrorphan block alpha3beta4 neuronal nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 962-967, 2000

Hirose N, Murakawa K, Takada K, Oi Y, Suzuki T, Nagase H, et al. Interactions among mu- and delta-opioid receptors, especially putative delta1- and delta2-opioid receptors, promote dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroscience* 135: 213-225, 2005

Holden JE, Jeong Y, Forrest JM: The endogenous opioid system and clinical pain management. *AACN Clin Issues* 16: 291-301, 2005

Hong D, Conell-Price J, Cheng S, Flood P: Transdermal nicotine patch for postoperative pain management: A pilot dose-ranging study. *Anesth Analg*. 2008 107: 1005-1010, 2008

Houdi AA, Dasgupta R, Kindy M.: Effect of nicotine use and withdrawal on brain preproenkephalin A mRNA. *Brain Res* 799: 257-263, 1998

Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, Delgado-Escueta AV. Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci* 10: 267-282, 1990

Hukkanen J, Jacob P, 3rd, Benowitz NL: Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 57: 79-115, 2005

Hutchison KE, Monti PM, Rohsenow DJ, Swift RM, Colby SM, Gnys M, Niaura RS, Sirota AD: Effects of naltrexone with nicotine replacement on smoking cue reactivity: Preliminary results. *Psychopharmacology (Berl)* 142: 139-143, 1999

Huumeongelmaisten hoito (online). Käypä hoito –suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Päihdelääketieteen yhdistyksen asettama työryhmä. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim 2006 (viitattu 25.8.2012). Saatavilla Internetistä: www.kaypahoito.fi

Ismayilova N, Shoaib M: Alteration of intravenous nicotine self-administration by opioid receptor agonist and antagonists in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 210: 211-220, 2010

Isola R, Zhang H, Tejwani GA, Neff NH, Hadjiconstantinou M: Acute nicotine changes dynorphin and prodynorphin mRNA in the striatum. *Psychopharmacology (Berl)* 201: 507-516, 2009

Iwamoto ET: Characterization of the antinociception induced by nicotine in the pedunculopontine tegmental nucleus and the nucleus raphe magnus. *J Pharmacol Exp Ther* 257: 120-133, 1991

Jamner LD, Girdler SS, Shapiro D, Jarvik ME: Pain inhibition, nicotine, and gender. *Exp Clin Psychopharm* 6: 96-106, 1998

Jankowski CJ, Weingarten TN, Martin DP, Whalen FX, Gebhart JB, Liedl LM, Danielson DR, Nadeau AM, Schroeder DR, Warner DO, Sprung J: Randomised trial of intranasal nicotine and postoperative pain, nausea and vomiting in non-smoking women. *Eur J Anaesthesiol* 28: 585-591, 2011

Jensen AA, Frolund B, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P: Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem* 48: 4705-4745, 2005

Ji D, Lape R, Dani JA: Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 2001 31: 131-141, 2001

Ji, RR, Zhang Q, Law PY, Low HH, Elde R, Hökfelt T: Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci* 15: 8156-8166, 1995

Jiang HK, Owyang VV, Hong JS, Gallagher M: Elevated dynorphin in the hippocampal formation of aged rats: Relation to cognitive impairment on a spatial learning task. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2948-2951, 1989

- Jin W, Lee NM, Loh HH, Thayer SA: Dual excitatory and inhibitory effects of opioids on intracellular calcium in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Mol Pharmacol* 42: 1083-1089, 1992
- Jones IW, Wonnacott S: Precise localization of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area. *J Neurosci* 24: 11244-11252, 2004
- Jozwiak K, Moaddel R, Yamaguchi R, Maciuk A, Wainer IW: Non-competitive inhibitory activities of morphinan and morphine derivatives at the $\alpha 3 \beta 4$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor determined using nonlinear chromatography and chemometric techniques. *Pharm Res* 23: 2175-2182, 2006
- Karhu D, Fradette C, Potgieter MA, Ferreira MM, Terblanche J: Comparative pharmacokinetics of a once-daily tramadol extended-release tablet and an immediate-release reference product following single-dose and multiple-dose administration. *J Clin Pharmacol* 50: 544-553, 2010
- Karlin A: Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 15: 1231-1244, 1995
- Karras A, Kane JM: Naloxone reduces cigarette smoking. *Life Sci* 27: 1541-1545, 1980
- Kasai H: Voltage- and time-dependent inhibition of neuronal calcium channels by a GTP-binding protein in a mammalian cell line. *J Physiol* 448: 189-209, 1992
- Khiroug SS, Harkness PC, Lamb PW, Sudweeks SN, Khiroug L, Millar NS, Yakel JL: Rat nicotinic ACh receptor $\alpha 7$ and $\beta 2$ subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol* 540: 425-434, 2002
- Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C: Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 66: 285-306, 2002
- Kiguchi N, Maeda T, Tsuruga M, Yamamoto A, Yamamoto C, Ozaki M, Kishioka S: Involvement of spinal met-enkephalin in nicotine-induced antinociception in mice. *Brain Res* 1189: 70-77, 2008
- Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux JP: Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci* 21: 1452-1463, 2001
- Kwiat GC, Basbaum AI: The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. *Somatosens Mot Res* 9: 157-173, 1992
- Land BB, Bruchas MR, Lemos JC, Xu M, Melief EJ, Chavkin C: The dysphoric component of stress is encoded by activation of the dynorphin kappa-opioid system. *J Neurosci* 28: 407-414, 2008

Laviolette SR, Alexson TO, van der Kooy D: Lesions of the tegmental pedunculopontine nucleus block the rewarding effects and reveal the aversive effects of nicotine in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 22: 8653-8660, 2002

Laviolette SR, van der Kooy D: Blockade of mesolimbic dopamine transmission dramatically increases sensitivity to the rewarding effects of nicotine in the ventral tegmental area. *Mol Psychiatry* 8: 50-59, 2003

Laviolette SR, van der Kooy D: The neurobiology of nicotine addiction: Bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 5: 55-65, 2004

Law PY, Wong YH, Loh HH: Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 389-430, 2000

Le Foll B, Diaz J, Sokoloff P: Increased dopamine D3 receptor expression accompanying behavioral sensitization to nicotine in rats. *Synapse* 47: 176-183, 2003

Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL: Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev* 89: 1379-1412, 2009

Lecca D, Cacciapaglia F, Valentini V, Gronli J, Spiga S, Di Chiara G: Preferential increase of extracellular dopamine in the rat nucleus accumbens shell as compared to that in the core during acquisition and maintenance of intravenous nicotine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 184: 435-446, 2006

Lee CH, Zhu C, Malysz J, Campbell T, Shaughnessy T, Honore P, et al. $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptor positive allosteric modulation: An approach for improving the therapeutic index of $\alpha 4\beta 2$ nAChR agonists in pain. *Biochem Pharmacol* 82: 959-966, 2011

Lemon SC, Friedmann PD, Stein MD: The impact of smoking cessation on drug abuse treatment outcome. *Addict Behav* 28: 1323-1331, 2003

Levin ED, Simon BB: Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology (Berl)* 138: 217-230, 1998

Li X, Eisenach JC: Nicotinic acetylcholine receptor regulation of spinal norepinephrine release. *Anesthesiology* 96: 1450-1456, 2002

Liu Q, Huang Y, Xue F, Simard A, DeChon J, Li G, Zhang J, Lucero L, Wang M, Sierks M, Hu G, Chang Y, Lukas RJ, Wu J: A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *J Neurosci* 29: 918-929, 2009

Liu X, Palmatier MI, Caggiula AR, Sved AF, Donny EC, Gharib M, Booth S: Naltrexone attenuation of conditioned but not primary reinforcement of nicotine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 202: 589-598, 2009

Liukas A, Hagelberg NM, Kuusniemi K, Neuvonen PJ, Olkkola KT: Inhibition of cytochrome P450 3A by clarithromycin uniformly affects the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxycodone in young and elderly volunteers. *J Clin Psychopharmacol* 31: 302-308, 2011

Loacker S, Sayyah M, Wittmann W, Herzog H, Schwarzer C: Endogenous dynorphin in epileptogenesis and epilepsy: Anticonvulsant net effect via kappa opioid receptors. *Brain* 130: 1017-1028, 2007

Löffler M, Bubl B, Huethe F, Hubbe U, McIntosh JM, Jackisch R, Feuerstein TJ: Dopamine release in human neocortical slices: Characterization of inhibitory autoreceptors and of nicotinic acetylcholine receptor-evoked release. *Brain Res Bull* 68: 361-373, 2006

Lukas RJ, Norman SA, Lucero L: Characterization of nicotinic acetylcholine receptors expressed by cells of the SH-SY5Y human neuroblastoma clonal line. *Mol Cell Neurosci* 4: 1-12, 1993

Lukas RJ, Fryer JD, Eaton JB, Gentry CL: Some methods for studies of nicotinic acetylcholine receptor pharmacology. *Kirjassa Nicotinic Receptors and the Nervous System* ss 3-27, 2. painos. Toim. Levin E, CRC Press, Boca Raton 2002

Macdonald RL, Nelson PG: Specific-opiate-induced depression of transmitter release from dorsal root ganglion cells in culture. *Science* 199: 1449-1451, 1978

Madsen BW, Albuquerque EX: The narcotic antagonist naltrexone has a biphasic effect on the nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett* 182: 20-24, 1985

Maisonneuve IM, Glick SD: (+/-)Cyclazocine blocks the dopamine response to nicotine. *Neuroreport* 10: 693-696, 1999

Mansour A, Hoversten MT, Taylor LP, Watson SJ, Akil H: The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: Evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain Res* 700: 89-98, 1995

Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS. Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron* 33: 905-919, 2002

Margolis EB, Hjelmstad GO, Bonci A, Fields HL: Both kappa and mu opioid agonists inhibit glutamatergic input to ventral tegmental area neurons. *J Neurophysiol* 93: 3086-3093, 2005

Marks MJ, Burch JB, Collins AC: Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 226: 817-825, 1983

Marks MJ, Whiteaker P, Calcaterra J, Stitzel JA, Bullock AE, Grady SR, Picciotto MR, Changeux JP, Collins AC: Two pharmacologically distinct components of nicotinic receptor-mediated rubidium efflux in mouse brain require the beta2 subunit. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 1090-1103, 1999

Marks MJ, Stitzel JA, Grady SR, Picciotto MR, Changeux JP, Collins AC: Nicotinic-agonist stimulated $^{86}\text{Rb}^+$ efflux and [^3H]epibatidine binding of mice differing in beta2 genotype. *Neuropharmacology* 39: 2632-2645, 2000

Marks MJ, Laverty DS, Whiteaker P, Salminen O, Grady SR, McIntosh JM, Collins AC: John Daly's compound, epibatidine, facilitates identification of nicotinic receptor subtypes. *J Mol Neurosci* 40: 96-104, 2010

Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE: The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 197: 517-532, 1976

Mason P: Contributions of the medullary raphe and ventromedial reticular region to pain modulation and other homeostatic functions. *Annu Rev Neurosci* 24: 737-777, 2001

Mathers CD, Loncar D: Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3: 2011-2030, 2006

Mathieu-Kia AM, Fan LQ, Kreek MJ, Simon EJ, Hiller JM: Mu-, delta- and kappa-opioid receptor populations are differentially altered in distinct areas of postmortem brains of alzheimer's disease patients. *Brain Res* 893: 121-134, 2001

Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, et al. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383: 819-823, 1996

May CN, Dashwood MR, Whitehead CJ, Mathias CJ: Differential cardiovascular and respiratory responses to central administration of selective opioid agonists in conscious rabbits: Correlation with receptor distribution. *Br J Pharmacol* 98: 903-913, 1989

McCool RM, Paschall Richter K: Why do so many drug users smoke? *J Subst Abuse Treat* 25: 43-49, 2003

McGehee DS, Role LW: Presynaptic ionotropic receptors. *Curr Opin Neurobiol* 6: 342-349, 1996

Mello NK, Mendelson JH, Sellers ML, Kuehnle JC: Effects of heroin self-administration on cigarette smoking. *Psychopharmacology (Berl)* 67: 45-52, 1980

Metcalf G, Rees JM, Ward SJ: In vivo antagonism of analgesia and respiratory depression induced by proposed mu and kappa opiate agonists. *Br J Pharmacol* 66: 473-474, 1979

Millar NS, Gotti C: Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56: 237-246, 2009

Millar NS, Harkness PC: Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Membr Biol* 25: 279-292, 2008

Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier J-C: ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341: 33-38, 1994

Mroziwicz M, Tyndale RF: Pharmacogenetics: A tool for identifying genetic factors in drug dependence and response to treatment. *Addict Sci Clin Pract* 5: 17-29, 2010

Nashmi R, Dickinson ME, McKinney S, Jareb M, Labarca C, Fraser SE, Lester HA: Assembly of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors assessed with functional fluorescently labeled subunits: Effects of localization, trafficking, and nicotine-induced upregulation in clonal mammalian cells and in cultured midbrain neurons. *J Neurosci* 23: 11554-11567, 2003

Nashmi R, Lester H: Cell autonomy, receptor autonomy, and thermodynamics in nicotine receptor up-regulation. *Biochem Pharmacol* 74: 1145-1154, 2007

Navolotskaya EV, Malkova NV, Zargarova TA, Lepikhova TN, Zav'yalov VP, Lipkin VM: Synthetic beta-endorphin-like peptide immunorphan binds to non-opioid receptors for beta-endorphin on T lymphocytes. *Peptides* 22: 2009-2013, 2001

Nieminen TH, Hagelberg NM, Saari TI, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Laine K, Olkkola KT: Oxycodone concentrations are greatly increased by the concomitant use of ritonavir or lopinavir/ritonavir. *Eur J Clin Pharmacol* 66: 977-985, 2010

North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ: Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5487-5491, 1987

Olson LC, Hong D, Conell-Price JS, Cheng S, Flood P: A transdermal nicotine patch is not effective for postoperative pain management in smokers: A pilot dose-ranging study. *Anesth Analg* 109: 1987-1991, 2009

O'Malley SS, Cooney JL, Krishnan-Sarin S, Dubin JA, McKee SA, Cooney NL, Blakeslee A, Meandzija B, Romano-Dahlgard D, Wu R, Makuch R, Jatlow P: A controlled trial of naltrexone augmentation of nicotine replacement therapy for smoking cessation. *Arch Intern Med* 166: 667-674, 2006

Omelchenko N, Sesack SR: Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 483: 217-235, 2005

Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest* 120: 3779-3787, 2010

Pacheco MA, Pastoor TE, Lukas RJ, Wecker L: Characterization of human $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptors stably expressed in SH-EP1 cells. *Neurochem Res* 26: 683-693, 2001

Pajusko B, Chiamulera C, Quaglio G, Moro L, Casari R, Amen G, et al. Tobacco addiction and smoking status in heroin addicts under methadone vs. buprenorphine therapy. *Int J Environ Res Public Health* 9: 932-942, 2012

Pakkanen JS, Nousiainen H, Yli-Kauhaluoma J, Kylänlahti I, Möykkynen T, Korpi ER, Peng J-H, Lukas RJ, Ahtee L, Tuominen RK: Methadone increases intracellular calcium in SH-SY5Y and SH-EP1- $\alpha 7$ cells by activating neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 94: 1329-1341, 2005

Pandya A, Yakel JL: Allosteric modulator desformylflustrabromine relieves the inhibition of $\alpha 2\beta 2$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by β -amyloid(1-42) peptide. *J Mol Neurosci* 45: 42-47, 2011

Papke RL, Heinemann SF: The role of the $\beta 4$ -subunit in determining the kinetic properties of rat neuronal nicotinic acetylcholine $\alpha 3$ -receptors. *J Physiol* 440: 95-112, 1991

Papke RL, Meyer E, Nutter T, Uteshev VV: $\alpha 7$ receptor-selective agonists and modes of $\alpha 7$ receptor activation. *Eur J Pharmacol* 393: 179-195, 2000

Pasternack GW (toim.): The Opiate Receptors. 2. painos. Humana Press Inc, New York, 2011

Patrick J, Stallcup B: α -bungarotoxin binding and cholinergic receptor function on a rat sympathetic nerve line. *J Biol Chem* 252: 8629-8633, 1977

Peckham EM, Traynor JR: Comparison of the antinociceptive response to morphine and morphine-like compounds in male and female sprague-dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 1195-1201, 2006

Peng X, Katz M, Gerzanich V, Anand R, Lindström J: Human $\alpha 7$ acetylcholine receptor: Cloning of the $\alpha 7$ subunit from the SH-SY5Y cell line and determination of pharmacological properties of native receptors and functional $\alpha 7$ homomers expressed in xenopus oocytes. *Mol Pharmacol* 45: 546-554, 1994

Peng X, Gerzanich V, Anand R, Wang F, Lindström J: Chronic nicotine treatment up-regulates $\alpha 3$ and $\alpha 7$ acetylcholine receptor subtypes expressed by the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Mol Pharmacol* 51: 776-784, 1997

- Perez XA, Ly J, McIntosh JM, Quik M: Long-term nicotine exposure depresses dopamine release in nonhuman primate nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 342: 335-344, 2012
- Perkins KA, Grobe JE, Stiller RL, Scierka A, Goettler J, Reynolds W, Jennings JR: Effects of nicotine on thermal pain detection in humans. *Exp Clin Psychopharmacol* 2: 95-106, 1994
- Perry E, Walker M, Grace J, Perry R: Acetylcholine in mind: A neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci* 22: 273-280, 1999
- Pertovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol* 80: 53-83, 2006
- Pfeiffer A, Brantl V, Herz A, Emrich HM. Psychotomimesis mediated by kappa opiate receptors. *Science* 233: 774-776, 1986
- Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Lena C, Marubio LM, Pich EM, Fuxe K, Changeux JP: Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* 391: 173-177, 1998
- Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA: Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390: 401-404, 1997
- Pierce PA, Xie GX, Levine JD, Peroutka SJ: 5-hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: A polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70: 553-559, 1996
- Pohl M, Ballet S, Collin E, Mauborgne A, Bourgoin S, Benoliel JJ, Hamon M, Cesselin F: Enkephalinergic and dynorphinergic neurons in the spinal cord and dorsal root ganglia of the polyarthritic rat - in vivo release and cDNA hybridization studies. *Brain Res* 749: 18-28, 1997
- Pons S, Fattore L, Cossu G, Tolu S, Porcu E, McIntosh JM, Changeux JP, Maskos U, Fratta W: Crucial role of alpha4 and alpha6 nicotinic acetylcholine receptor subunits from ventral tegmental area in systemic nicotine self-administration. *J Neurosci* 28: 12318-12327, 2008
- Potrebic SB, Fields HL, Mason P. Serotonin immunoreactivity is contained in one physiological cell class in the rat rostral ventromedial medulla. *J Neurosci* 14: 1655-1665, 1994
- Przewlocki R, Przewlocka B: Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol* 429: 79-91, 2001
- Qiu YM, Liu YT, Li ST. Tramadol requirements may need to be increased for the perioperative management of pain in smokers. *Med Hypotheses* 77: 1071-1073, 2011

Quiding H, Anderson P, Bondesson U, Boreus LO, Hynning PA: Plasma concentrations of codeine and its metabolite, morphine, after single and repeated oral administration. *Eur J Clin Pharmacol* 30: 673-677, 1986

Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL: Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an 'atypical' opioid analgesic. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 275-285, 1992

Ramirez-Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L: Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* 380: 347-351, 1996

Rashid MH, Furue H, Yoshimura M, Ueda H: Tonic inhibitory role of alpha4beta2 subtype of nicotinic acetylcholine receptors on nociceptive transmission in the spinal cord in mice. *Pain* 2006 125: 125-135, 2006

Rezayof A, Zatali H, Haeri-Rohani A, Zarrindast MR: Dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors are involved in mediating morphine reward. *Behav Brain Res* 166: 281-290, 2006

Rittner HL, Labuz D, Schaefer M, Mousa SA, Schulz S, Schäfer M, Stein C, Brack A: Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells. *FASEB J* 20: 2627-2629, 2006

Robinson TE, Berridge KC: Incentive-sensitization and addiction. *Addiction*. 96: 103-114, 2001

Rogers JF, Findlay JW, Hull JH, Butz RF, Jones EC, Bustrack JA, Welch RM: Codeine disposition in smokers and nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther* 32: 218-227, 1982

Rohsenow DJ, Monti PM, Hutchison KE, Swift RM, MacKinnon SV, Sirota AD, Kaplan GB: High-dose transdermal nicotine and naltrexone: Effects on nicotine withdrawal, urges, smoking, and effects of smoking. *Exp Clin Psychopharmacol* 15: 81-92, 2007

206. Romano C, Goldstein A: Stereospecific nicotine receptors on rat brain membranes. *Science* 210: 647-650, 1980

Rowell PP, Li M: Dose-response relationship for nicotine-induced up-regulation of rat brain nicotinic receptors. *J Neurochem* 68: 1982-1989, 1997

Rowley TJ, Flood P: Isoflurane prevents nicotine-evoked norepinephrine release from the mouse spinal cord at low clinical concentrations. *Anesth Analg* 107: 885-889, 2008

Rueter LE, Meyer MD, Decker MW: Spinal mechanisms underlying A-85380-induced effects on acute thermal pain. *Brain Res* 872: 93-101, 2000

Russell MA, Jarvis M, Iyer R, Feyerabend C: Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *Br Med J* 280: 972-976, 1980

Sabey K, Paradiso K, Zhang J, Steinbach JH: Ligand binding and activation of rat nicotinic $\alpha 4\beta 2$ receptors stably expressed in HEK293 cells. *Mol Pharmacol* 55: 58-66, 1999

Sacaan AI, Menzaghi F, Dunlop JL, Correa LD, Whelan KT, Lloyd GK: Epibatidine: A nicotinic acetylcholine receptor agonist releases monoaminergic neurotransmitters: In vitro and in vivo evidence in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 509-515, 1996

Sallette J, Pons S, Devillers-Thiery A, Soudant M, Prado de Carvalho L, Changeux JP, Corringer JP: Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation. *Neuron* 46: 595-607, 2005

Salminen O, Murphy KL, McIntosh JM, Drago J, Marks MJ, Collins AC, Grady SR: Subunit composition and pharmacology of two classes of striatal presynaptic nicotinic acetylcholine receptors mediating dopamine release in mice. *Mol Pharmacol* 65: 1526-1535, 2004

Schmidt BL, Tambeli CH, Gear RW, Levine JD: Nicotine withdrawal hyperalgesia and opioid-mediated analgesia depend on nicotine receptors in nucleus accumbens. *Neuroscience* 106: 129-136, 2001

Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW: Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: A nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13: 596-604, 1993

Selley DE, Breivogel CS, Childers SR: Modification of G protein-coupled functions by low-pH pretreatment of membranes from NG108-15 cells: Increase in opioid agonist efficacy by decreased inactivation of G proteins. *Mol Pharmacol* 44: 731-741, 1993

Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M: Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 3365-3369, 1977

Shiraishi M, Minami K, Uezono Y, Yanagihara N, Shigematsu A, Shibuya I: Inhibitory effects of tramadol on nicotinic acetylcholine receptors in adrenal chromaffin cells and in xenopus oocytes expressing $\alpha 7$ receptors. *Br J Pharmacol* 136: 207-216, 2002

Shytle RD, Silver AA, Lukas RJ, Newman MB, Sheehan DV, Sanberg PR: Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants. *Mol Psychiatry* 7: 525-535, 2002

Skok VI: Nicotinic acetylcholine receptors in autonomic ganglia. *Auton Neurosci* 97: 1-11, 2002

Smith AI, Funder JW: Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr Rev* 9: 159-179, 1988

Soliakov L, Wonnacott S: Involvement of protein kinase C in the presynaptic nicotinic modulation of [³H]-dopamine release from rat striatal synaptosomes. *Br J Pharmacol* 132: 785-791, 2001

Spiga R, Martinetti MP, Meisch RA, Cowan K, Hursh S: Methadone and nicotine self-administration in humans: A behavioral economic analysis. *Psychopharmacology (Berl)* 178: 223-231, 2005

Spiga R, Schmitz J, Day J, 2nd: Effects of nicotine on methadone self-administration in humans. *Drug Alcohol Depend* 50: 157-165, 1998

Stamford JA: Descending control of pain. *Br J Anaesth* 75: 217-227, 1995

Stein C, Machelska H, Binder W, Schafer M: Peripheral opioid analgesia. *Curr Opin Pharmacol* 1: 62-65, 2001

Stein MD, Anderson BJ: Nicotine and drug interaction expectancies among methadone maintained cigarette smokers. *J Subst Abuse Treat* 24: 357-361, 2003

Stein C, Lang LJ: Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr Opin Pharmacol* 9: 3-8, 2009

Stinus L, Cador M, Le Moal M: Interaction between endogenous opioids and dopamine within the nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci* 654: 254-273, 1992

Stinus L, Koob GF, Ling N, Bloom FE, Le Moal M: Locomotor activation induced by infusion of endorphins into the ventral tegmental area: Evidence for opiate-dopamine interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 2323-2327, 1980

Storch A, Schrattenholz A, Cooper JC, Abdel Ghani EM, Gutbrod O, Weber KH, Reinhardt S, Lobron C, Hermesen B, Soskic V, Pereira EFR, Albuquerque EX, Methfessel, Maelicke A: Physostigmine, galanthamine and codeine act as 'noncompetitive nicotinic receptor agonists' on clonal rat pheochromocytoma cells. *Eur J Pharmacol* 290: 207-219, 1995

Sudweeks SN, Yakel JL: Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons. *J Physiol* 527: 515-28, 2000

Surprenant A, Shen KZ, North RA, Tatsumi H: Inhibition of calcium currents by noradrenaline, somatostatin and opioids in guinea-pig submucosal neurones. *J Physiol* 431: 585-608, 1990

Sutherland G, Stapleton JA, Russell MA, Feyerabend C: Naltrexone, smoking behaviour and cigarette withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)* 120: 418-425, 1995

Svingos AL, Colago EE, Pickel VM: Cellular sites for dynorphin activation of kappa-opioid receptors in the rat nucleus accumbens shell. *J Neurosci* 19: 1804-1813, 1999

Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP. Nicotinic receptors: Allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 8: 733-750, 2009

Tanda G, Di Chiara G: A dopamine-mu1 opioid link in the rat ventral tegmentum shared by palatable food (fonzies) and non-psychostimulant drugs of abuse. *Eur J Neurosci* 10: 1179-1187, 1998

Thorn CF, Klein TE, Altman RB: Codeine and morphine pathway. *Pharmacogenet Genomics* 19: 556-558, 2009

Todtenkopf MS, Marcus JF, Portoghese PS, Carlezon WA,Jr: Effects of kappa-opioid receptor ligands on intracranial self-stimulation in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 172: 463-470, 2004

Tome AR, Izaguirre V, Rosario LM, Cena V, Gonzalez-Garcia C: Naloxone inhibits nicotine-induced receptor current and catecholamine secretion in bovine chromaffin cells. *Brain Res* 903: 62-65, 2001

Tracey I: Nociceptive processing in the human brain. *Curr Opin Neurobiol*, 15: 478-487, 2005

Traynor JR: Epibatidine and pain. *Br J Anaesth* 81: 69-76, 1998

Trigo JM, Zimmer A, Maldonado R: Nicotine anxiogenic and rewarding effects are decreased in mice lacking beta-endorphin. *Neuropharmacology* 56: 1147-1153, 2009

Trigo JM, Martin-Garcia E, Berrendero F, Robledo P, Maldonado R: The endogenous opioid system: A common substrate in drug addiction. *Drug Alcohol Depend* 108: 183-194, 2010

Tsuneki H, Klink R, Lena C, Korn H, Changeux JP: Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur J Neurosci* 12: 2475-2485, 2000

Turan A, White PF, Koyuncu O, Karamanliodlu B, Kaya G, Apfel CC: Transdermal nicotine patch failed to improve postoperative pain management. *Anesth Analg* 107: 1011-1017, 2008

Vallejo YF, Buisson B, Bertrand D, Green WN: Chronic nicotine exposure upregulates nicotinic receptors by a novel mechanism. *J Neurosci* 25: 5563-5572, 2005

Vastola BJ, Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP: Nicotine-induced conditioned place preference in adolescent and adult rats. *Physiol Behav* 77: 107-114, 2002

Verma-Gandhu M, Bercik P, Motomura Y, Verdu EF, Khan WI, Blennerhassett PA, Wang L, El-Sharkawy RT, Collins SM: CD4+ T-cell modulation of visceral nociception in mice. *Gastroenterology* 130: 1721-1728, 2006

Vihavainen T, Piltonen M, Tuominen RK, Korpi ER, Ahtee L: Morphine-nicotine interaction in conditioned place preference in mice after chronic nicotine exposure. *Eur J Pharmacol* 587: 169-174, 2008a

Vihavainen T, Relander TR, Leiviska R, Airavaara M, Tuominen RK, Ahtee L, Piepponen TP: Chronic nicotine modifies the effects of morphine on extracellular striatal dopamine and ventral tegmental GABA. *J Neurochem* 107: 844-854, 2008b

Vinclair M, Eisenach JC: Plasticity of spinal nicotinic acetylcholine receptors following spinal nerve ligation. *Neurosci Res* 48: 139-145, 2004

Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL: Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* 73: 953-990, 2004

Wallace TL, Porter R: Targeting the nicotinic $\alpha 7$ acetylcholine receptor to enhance cognition in disease. *Biochem Pharmacol* 82: 891-903, 2011

Wang Y, Su DM, Wang RH, Liu Y, Wang H: Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain. *Neuroscience* 132: 49-56, 2005

Wapf V, Schaub M, Kläusler B, Boesch L, Stohler R, Eich D: The barriers to smoking cessation in swiss methadone and buprenorphine-maintained patients. *Harm Reduct J* 18: 1-10, 2008

Wewers ME, Dhatt R, Tejwani GA: Naltrexone administration affects ad libitum smoking behavior. *Psychopharmacology (Berl)* 140: 185-190, 1998

Whistler JL, Chuang HH, Chu P, Jan LY, von Zastrow M: Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: Implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* 23: 737-746, 1999

Whiteaker P, Sharples CG, Wonnacott S: Agonist-induced up-regulation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in M10 cells: Pharmacological and spatial definition. *Mol Pharmacol* 53: 950-962, 1998

Wonnacott S: Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20: 92-98, 1997

Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA: Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J Neurosci* 23: 3176-3185, 2003

Wu J, Lukas RJ: Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 82: 800-807, 2011

Xiao Y, Smith RD, Caruso FS, Kellar KJ: Blockade of rat $\alpha 3\beta 4$ nicotinic receptor function by methadone, its metabolites, and structural analogs. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 366-371, 2001

Xie R, Hammarlund-Udenaes M: Blood-brain barrier equilibration of codeine in rats studied with microdialysis. *Pharm Res* 15: 570-575, 1998

Xu W, Gelber S, Orr-Urtreger A, Armstrong D, Lewis RA, Ou CN, Patrick J, Role L, De Biasi M, Beaudet AL: Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the $\alpha 3$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5746-5751, 1999

Xu M, Petraschka M, McLaughlin JP, Westenbroek RE, Caron MG, Lefkowitz RJ, Czyzyk TA, Pintar JE, Terman GW, Chavkin C: Neuropathic pain activates the endogenous kappa opioid system in mouse spinal cord and induces opioid receptor tolerance. *J Neurosci* 24: 4576-4584, 2004

Yagoubian B, Akkara J, Afzali P, Alfi DM, Olson L, Conell-Price J, Yeh J, Eisig SB, Flood P: Nicotine nasal spray as an adjuvant analgesic for third molar surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 69: 1316-1319, 2011

Young HS, Herbet LG, Skita V: α -bungarotoxin binding to acetylcholine receptor membranes studied by low angle X-ray diffraction. *Biophys J* 85: 943-953, 2003

Yue QY, Svensson JO, Alm C, Sjoqvist F, Sawe J: Codeine O-demethylation co-segregates with polymorphic debrisoquine hydroxylation. *Br J Clin Pharmacol* 28: 639-645, 1989

Zhang J, Berg DK: Reversible inhibition of GABAA receptors by $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors on the vertebrate postsynaptic neurons. *J Physiol* 579: 753-763, 2007

Zhang T, Zhang L, Liang Y, Siapas AG, Zhou FM, Dani JA: Dopamine signaling differences in the nucleus accumbens and dorsal striatum exploited by nicotine. *J Neurosci* 29: 4035-4043, 2009

Zhu CZ, Chin CL, Rustay NR, Zhong C, Mikusa J, Chandran P, Salyers A, Gomez e, Simler G, Lewis LG, Gauvin D, Baker S, Pai M, Tovcimak A, Brown J, Komater V, Fox GB, Decker MW, Jacobson PB, Gopalakrishnan M, Lee CH, Honore P: Potentiation of analgesic efficacy but not side effects: Co-administration of an $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonist and its positive allosteric modulator in experimental models of pain in rats. *Biochem Pharmacol* 82: 967-976, 2011